

Université de Montréal

**Caractérisation d'un nouveau récepteur à octopamine
exprimé chez la palourde
*Spisula solidissima***

par
Véronique Blais

Département de sciences biomédicales
Faculté de médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures et postdoctorales
en vue de l'obtention du grade de Maître ès sciences (M.Sc.)
en sciences biomédicales
option générale

octobre, 2009

© Véronique Blais, 2009

Université de Montréal
Faculté des études supérieures et postdoctorales

Ce mémoire intitulé :

Caractérisation d'un nouveau récepteur à octopamine exprimé chez la palourde
Spisula solidissima

Présenté par :
Véronique Blais

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Euridice Carmona, président-rapporteur
François Dubé, directeur de recherche
Annie Angers, membre du jury

Résumé

À partir des ovocytes de la palourde *Spisula solidissima*, un ADNc codant un récepteur nommé Spi-OAR a été cloné et séquencé. Une analyse de la séquence en acides aminés a indiqué que ce nouveau récepteur possède une forte similarité avec les récepteurs β -adrénergiques et les récepteurs à octopamine. En effet, il est étroitement lié à la classe des récepteurs à octopamine « β -adrénergique-like » couplés à une protéine Gs. L'ADNc de Spi-OAR a été introduit dans un vecteur d'expression (pCEP4) et un épitope reconnaissable par un anticorps commercial a été ajouté au segment N-terminal. Cette construction a été transfectée dans des cellules hôtes (HEK 293) et des études d'immunofluorescence ont montré une expression efficace du récepteur au niveau membranaire. Également, des mesures d'AMPC pour les cellules exprimant Spi-OAR ont révélé une augmentation de ce messager secondaire lors de l'ajout de l'octopamine, et dans une moindre mesure, la tyramine, tandis que la dopamine, la sérotonine et l'histamine n'ont engendré aucun effet. Une légère activité constitutive de ce récepteur dans les cellules hôtes a été observée. De plus, une analyse RT-PCR avec des oligonucléotides spécifiques a révélé l'ARNm de Spi-OAR non seulement dans les ovocytes, mais aussi dans les gonades, le cœur, les muscles adducteurs, les branchies et les ganglions suggérant que ce récepteur soit exprimé de façon ubiquitaire dans divers tissus et dans différents stades embryonnaires chez la palourde. En outre, des études avec des ovocytes isolés n'ont montré aucun effet de l'octopamine sur la réactivation méiotique. Des études éventuelles pourront finalement confirmer le rôle fonctionnel de Spi-OAR.

Mots-clés : octopamine, RCPG, palourde *Spisula solidissima*, mollusque, ovocyte, AMPC, calcium.

Abstract

A cDNA encoding for an octopamine receptor named Spi-OAR was cloned and sequenced from the surf clam *Spisula solidissima* oocytes. An analysis of its predicted amino acid sequence showed a high degree of similarity with β -adrenergic and octopamine receptors. This receptor qualifies as a novel receptor closely related to the proposed class of insect octopamine « β -adrenergic-like » receptors coupled to Gs protein. This cDNA was introduced into an expression vector (pCEP4), with an added N-terminal FLAG tag sequence, and transfected in host cells (HEK 293). Immunofluorescence studies showed expression of the receptor with a proper localization to the plasma membrane. Measurements of cAMP in transfected cells revealed that addition of octopamine, and to a lower extent, tyramine induced a rise in cAMP while dopamine, serotonin and histamine had no effect. Overexpression of Spi-OAR in mammalian cells induced slight constitutive increase of cAMP. An RT-PCR analysis with specific oligonucleotides revealed the presence of the receptor mRNA not only in oocytes but also in whole gonads, heart, adductor muscle, gills and ganglia suggesting that this receptor is likely ubiquitously expressed. Expression of Spi-OAR was also detected at different embryonic stages. Despite the demonstrated expression of Spi-OAR in oocytes, octopamine had no effect on meiotic reinitiation. Further studies will examine the function of Spi-OAR.

Keywords : octopamine, GPCR, surf clam *Spisula solidissima*, mollusc, oocyte, cAMP, calcium.

Table des matières

Résumé.....	i
Abstract.....	ii
Table des matières.....	iii
Liste des figures.....	vi
Liste des tableaux.....	ix
Abréviations.....	x
Remerciements.....	xiii
1. INTRODUCTION.....	1
1.1 Les récepteurs couplés aux protéines G (RCPG).....	1
<i>1.1.1 Généralités.....</i>	<i>1</i>
<i>1.1.2 Les caractéristiques structurales des RCPG.....</i>	<i>2</i>
<i>1.1.3 Les protéines qui interagissent avec les RCPG.....</i>	<i>5</i>
<i>1.1.4 Les protéines G.....</i>	<i>6</i>
<i>1.1.5 Les voies principales de transduction du signal des RCPG.....</i>	<i>7</i>
<i>1.1.6 La classification des RCPG.....</i>	<i>9</i>
<i>1.1.7 L'activité constitutive.....</i>	<i>11</i>
<i>1.1.8 La régulation des RCPG.....</i>	<i>14</i>
1.2 L'octopamine (OA).....	16
<i>1.2.1 Les fonctions.....</i>	<i>16</i>
<i>1.2.2 Les rôles de l'OA en reproduction.....</i>	<i>18</i>
<i>1.2.3 Les récepteurs à OA.....</i>	<i>22</i>
<i>1.2.4 La classification des récepteurs à OA.....</i>	<i>23</i>
<i>1.2.5 La tyramine.....</i>	<i>27</i>
1.3 La palourde <i>Spisula solidissima</i>.....	28
<i>1.3.1 Le modèle animal.....</i>	<i>28</i>
<i>1.3.2 La reproduction.....</i>	<i>28</i>
<i>1.3.3 L'activation méiotique.....</i>	<i>31</i>
<i>1.3.4 Les rôles de la 5-HT dans la reproduction.....</i>	<i>35</i>
1.4 Les objectifs de l'étude.....	36

2. ARTICLE	37
2.1 Abstract	38
2.2 Introduction	39
2.3 Materials and methods	41
2.3.1 <i>Animals and tissue preparations</i>	41
2.3.2 <i>Handling of oocytes and embryos</i>	42
2.3.3 <i>Isolation and purification of initial clones</i>	43
2.3.4 <i>Sequence alignments and phylogenetic analyses</i>	44
2.3.5 <i>Vector construction and transfection of HEK 293 cells</i>	44
2.3.6 <i>cAMP measurements in transfected HEK 293 cells</i>	45
2.3.7 <i>Indirect immunofluorescence</i>	46
2.3.8 <i>Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)</i>	47
2.3.9 <i>Intracellular Ca²⁺ measurement in Spi-OAR transfected cells</i>	48
2.3.10 <i>Statistical analysis</i>	49
2.4 Results	50
2.4.1 <i>Cloning and sequence analysis of Spi-OAR cDNA</i>	50
2.4.2 <i>Expression in HEK 293 cells and receptor signalling assay</i>	52
2.4.3 <i>Constitutive receptor activity</i>	54
2.4.4 <i>Pharmacological analysis of Spi-OAR</i>	55
2.4.5 <i>Expression of endogenous Spi-OAR</i>	55
2.4.6 <i>Effect of octopamine on oocyte meiotic reinitiation</i>	56
2.5 Discussion	77
2.6 Acknowledgements	83
2.7 References	84
3. DISCUSSION GÉNÉRALE ET CONCLUSION	93
3.1 Les motifs conservés	93
3.2 Les voies de signalisation	95
3.3 L'expression hétérologue	96

3.4	L'immunofluorescence	98
3.5	L'activité constitutive	99
3.6	L'analyse phylogénétique	100
3.7	Le profil pharmacologique	102
3.8	La localisation de l'ARNm de Spi-OAR	103
3.9	La reproduction.....	104
4.	BIBLIOGRAPHIE.....	109

Liste des figures

1. INTRODUCTION

Figure 1	4
Schéma de la structure classique d'un RCPG.	
Figure 2	8
Schéma des voies de signalisation via les RCPG.	
Figure 3	10
Classification des RCPG.	
Figure 4	12
Modèles du complexe ternaire.	
Figure 5	15
Mécanisme de désensibilisation homologue et d'internalisation des RCPG.	
Figure 6	17
Biosynthèse de l'OA.	
Figure 7	29
Schéma représentant l'anatomie de la palourde.	
Figure 8	32
Classes d'ovocytes chez les mollusques.	

Figure 9	34
Schéma d'un ovocyte de palourde et des voies de signalisation induites par la 5-HT.	

2. ARTICLE

Figure 1	58
Nucleotide and deduced amino acid sequence of <i>Spisula</i> octopamine receptor (Spi-OAR) cDNA.	
Figure 2	60
Comparisons of Spi-OAR with other selected GPCRs.	
Figure 3	62
Phylogram analysis of Spi-OAR with selected invertebrate octopamine/tyramine receptors, molluscan aminergic receptors and other mammalian related GPCR.	
Figure 4	64
Immunofluorescence of HEK 293 cells expressing Spi-OAR.	
Figure 5	66
cAMP levels in HEK 293 cells expressing Spi-OAR and challenged with various aminergic ligands.	
Figure 6	68
Absence of Ca ²⁺ responses in Spi-OAR-transfected HEK 293 cells and the effect of altering internal calcium on cAMP levels.	

Figure 7	70
Spi-OAR dose-dependent increase of cAMP levels and basal constitutive activity in HEK cells.	
Figure 8	72
Effects of various agonists/antagonists on cAMP levels in HEK cells expressing Spi-OAR.	
Figure 9	74
RT-PCR analysis of Spi-OAR expression in various <i>Spisula</i> tissues.	
Figure 10	76
Absence of effect of octopamine on oocyte meiotic reinitiation as compared to serotonin and KCl.	

Liste des tableaux

1. INTRODUCTION

Tableau I.....	25
-----------------------	-----------

Classification des OAR selon Roeder.

Tableau II.....	26
------------------------	-----------

Classification des OAR selon Evans et Maqueira.

Abréviations

AC	adényle cyclase
ADNc	acide désoxyribonucléique complémentaire
AMPC	adénosine monophosphate cyclique
ARN	acide ribonucléique
ARNm	acide ribonucléique messenger
ATP	adénosine triphosphate
Ca ²⁺	calcium ionisé
CaKMII	protéine kinase II calmoduline-dépendante
CHO	ovaires d'hamster chinois
CLHP/DE	chromatographie liquide à haute pression avec détection électrochimique
COS	« CV-1 in Origin and carrying SV-40 »
DAG	diacylglycérol
D-PBS	Dulbecco's phosphate buffered saline

GDP	guanosine diphosphate
GRK	kinase des récepteurs couplés à la protéine G
GTP	guanosine 5`-triphosphate
GV	vésicule germinative
GVBD	rupture de la vésicule germinative
HEK 293	cellules rénales embryonnaires humaines
5-HT	sérotonine
IP ₃	inositol trisphosphate
NHERF	facteur de régulation pour l'échangeur Na ⁺ /H ⁺
NIH 3T3	fibroblastes embryonnaires de souris
OA	octopamine
OAMB	« octopamine receptor in mushroom bodies »
OAR	récepteur à octopamine
pHi	pH intracellulaire

PI	phosphatidylinositol
PI-3K	phosphatidylinositol 3-kinase
PIP ₂	phosphatidylinositol biphosphate
PKA	protéine kinase A
PKC	protéine kinase C
PLC- β	phospholipase C- β
Ra	récepteur actif
RCPG	récepteur couplé à la protéine G
Ri	récepteur inactif
RT-PCR	transcription inverse suivie d'une réaction en chaîne par polymérase
Sf9	cellules dérivées de l'insecte <i>Spodoptera frugiperda</i>
TAG	ganglion abdominal des aires thoracico-abdominales
T β h	tyramine- β -hydroxylase
TCD	enzyme tyrosine décarboxylase
TPH1	enzyme tryptophane hydroxylase 1

Remerciements

Je tiens à remercier énormément Dr Dubé pour sa grande disponibilité ainsi que pour son aide tout au long de mon projet de maîtrise. Je souhaite remercier les étudiants ainsi que le personnel du centre de recherche de l'hôpital Saint-Luc qui m'ont aidée et conseillée généreusement lors de mes expériences et qui ont su m'accorder de leur temps notamment Jean-Luc, Christian, M. Rose, M. Desjardins, Nathalie, Mohammed, Anna, Alexis, Mélanie, Karine, Henri, Safia, Annick et plusieurs autres. Je veux remercier spécialement les étudiants (John, Hellen, Nassim, Natalia, Reem, Maksym, Célia, Nicolas, Martin, Amin et Khalid) qui ont travaillé dans le laboratoire du Dr Dubé et que j'ai côtoyés avec plaisir durant mon projet. Je veux remercier Véronique Campbell et le professeur François-Joseph Lapointe pour leur assistance lors de l'analyse phylogénétique, M. Boileau pour son expertise en statistique ainsi que Marie-Eve Gervais pour la gestion de mon dossier. Je remercie Dre Annie Angers et Dre Euridice Carmona pour la correction de mon mémoire.

Je veux remercier Mabrouk pour son amour, mes parents Monique et André pour leurs encouragements dans mes études universitaires, ma sœur Marie-Chantale pour son dynamisme, mon frère Stéphane pour son sens de l'humour, ma grand-mère Marguerite pour son soutien dès mon jeune âge, mes nièces Juliette et Marianne pour leur joie de vivre, mes amies de longue date Marie-Hélène, Marie-Ève, Gabrielle et Mélanie pour leur écoute et leur présence. Je remercie également ma belle-famille.

1. INTRODUCTION

Ce mémoire porte sur la caractérisation du premier récepteur aminergique, Spi-OAR, cloné et séquencé chez la palourde (*Spisula solidissima*), et ce, à partir des acides désoxyribonucléiques complémentaires (ADNc) d'ovocytes. Lors d'une analyse préliminaire d'hydrophobicité de la séquence en acides aminés, les résultats portent à croire que Spi-OAR soit un récepteur couplé aux protéines G (RCPG) caractérisé par sept passages transmembranaires hydrophobes. La comparaison de cette séquence selon la base de données BLAST suggère que l'octopamine (OA) soit le ligand endogène spécifique de Spi-OAR. Par conséquent, cette introduction générale portera initialement sur les RCPG, des récepteurs ayant des implications biologiques majeures autant chez les invertébrés que chez les vertébrés. Par la suite, une seconde partie traitera de l'OA, l'amine biogène soupçonnée être le ligand de Spi-OAR. Finalement, le modèle animal, la palourde, sera abordé en mettant l'accent sur le système reproducteur femelle puisque l'ADNc de Spi-OAR provient des ovocytes. Cela suggère que ce nouveau récepteur pourrait alors avoir un rôle potentiel dans la reproduction de ce mollusque.

1.1 Les récepteurs couplés aux protéines G (RCPG)

1.1.1 Généralités

Présents chez tous les eucaryotes, les RCPG correspondent à la plus grande famille de récepteurs membranaires (Fredriksson et al., 2003). Les gènes codant pour cette superfamille sont considérablement importants. En effet, le séquençage du génome humain a permis de dénombrer plus de 800 gènes codant pour ces récepteurs cellulaires, ce qui correspond à plus de 1 % du génome humain (Lander et al., 2001). De façon similaire, chez différents invertébrés modèles dont le génome a

complètement été séquencé, on évalue qu'il existe un nombre considérable de gènes susceptibles de coder pour des RCPG, soit approximativement 1000 gènes chez le nématode (*Caenorhabditis elegans*) (Bargmann, 1998), 200 gènes chez la drosophile (*Drosophila melanogaster*) (Brody et Cravchik, 2000), 170 gènes chez l'ascidie (*Ciona intestinalis*) (Kamesh et al., 2008) et 900 gènes chez l'oursin (*Strongylocentrotus purpuratus*) (Sodergren et al., 2006). De plus, certains RCPG ont été identifiés chez plusieurs espèces primitives notamment chez les plantes (*Arabidopsis thaliana*) (Plakidou-Dymock et al., 1998), la levure (*Saccharomyces cerevisiae*) (Dohlman et al., 1991), la moisissure (*Dictyostelium discoideum*) (Devreotes, 1994), la pensée de mer (*Renilla koellikeri*) (Bouchard et al., 2003; Bouchard et al., 2004), le corail (*Acropora millepora*) (Anctil et al., 2007) ainsi que chez des protozoaires et des métazoaires ancestraux (New et Wong, 1998). Par conséquent, le mécanisme de transduction du signal via les RCPG est probablement un des plus anciens processus de signalisation transmembranaire qui est apparu vraisemblablement à un stade plutôt précoce au cours de l'évolution (Bockaert et Pin, 1999). En revanche, l'émergence évolutive des RCPG chez les vertébrés est difficile à déterminer en raison du peu de données en ce qui concerne le séquençage des RCPG chez les organismes davantage primitifs (Bockaert et Pin, 1999). Les récents progrès technologiques tels le clonage, le séquençage ainsi que l'expression hétérologue des récepteurs dans des cellules hôtes vont faciliter le processus de caractérisation de nouveaux RCPG autant chez les invertébrés que chez les vertébrés et permettront ultimement une meilleure compréhension de l'évolution des RCPG.

1.1.2 Les caractéristiques structurales des RCPG

Une importante diversité de ligands extracellulaires, structurellement et fonctionnellement différents, peuvent activer les RCPG : protéines, petits peptides, amines biogènes, acides gras, photons et molécules sensorielles, etc... (Marinissen et

Gutkind, 2001). Malgré la grande diversité de ligands possibles, les RCPG demeurent toutefois structurellement similaires (Fryxell, 1995). Ces récepteurs heptahéliques à une seule chaîne polypeptidique sont caractérisés par sept domaines transmembranaires hydrophobes (TM-I à TM-VII), par une extrémité N-terminale extracellulaire (NH₂), par un segment C-terminal cytoplasmique (COOH), le tout relié par trois boucles extracellulaires (E1, E2 et E3) ainsi que par trois boucles intracellulaires (I1, I2 et I3) (Ji et al., 1998; Lefkowitz, 2000) (Fig. 1, p.4). Ces protéines membranaires sont typiquement caractérisées par des sites potentiels de N-glycosylation, de palmitoylation, de phosphorylation pour diverses protéines kinases, de ponts disulfures ainsi que de modifications post-traductionnelles (Lefkowitz, 2000). Plusieurs motifs en acides aminés sont conservés chez les RCPG et se localisent principalement au niveau des sept passages transmembranaires (Oliveira et al., 1999). Par exemple, la famille de RCPG « Rhodopsin-like » se caractérise par certains résidus comme les acides aminés GN dans le TM-I, le motif LxxxD dans le TM-II, le motif NPxxY dans le TM-VI (Im, 2002) et le motif DRY situé à la fin de la jonction du TM-III (Oliveira et al., 1999). Ce dernier motif est fortement conservé et potentiellement impliqué dans la liaison avec l'agoniste, dans la conformation structurale, dans le processus d'activation ainsi que dans l'internalisation du récepteur (Arora et al., 1997; Fraser et al., 1988).

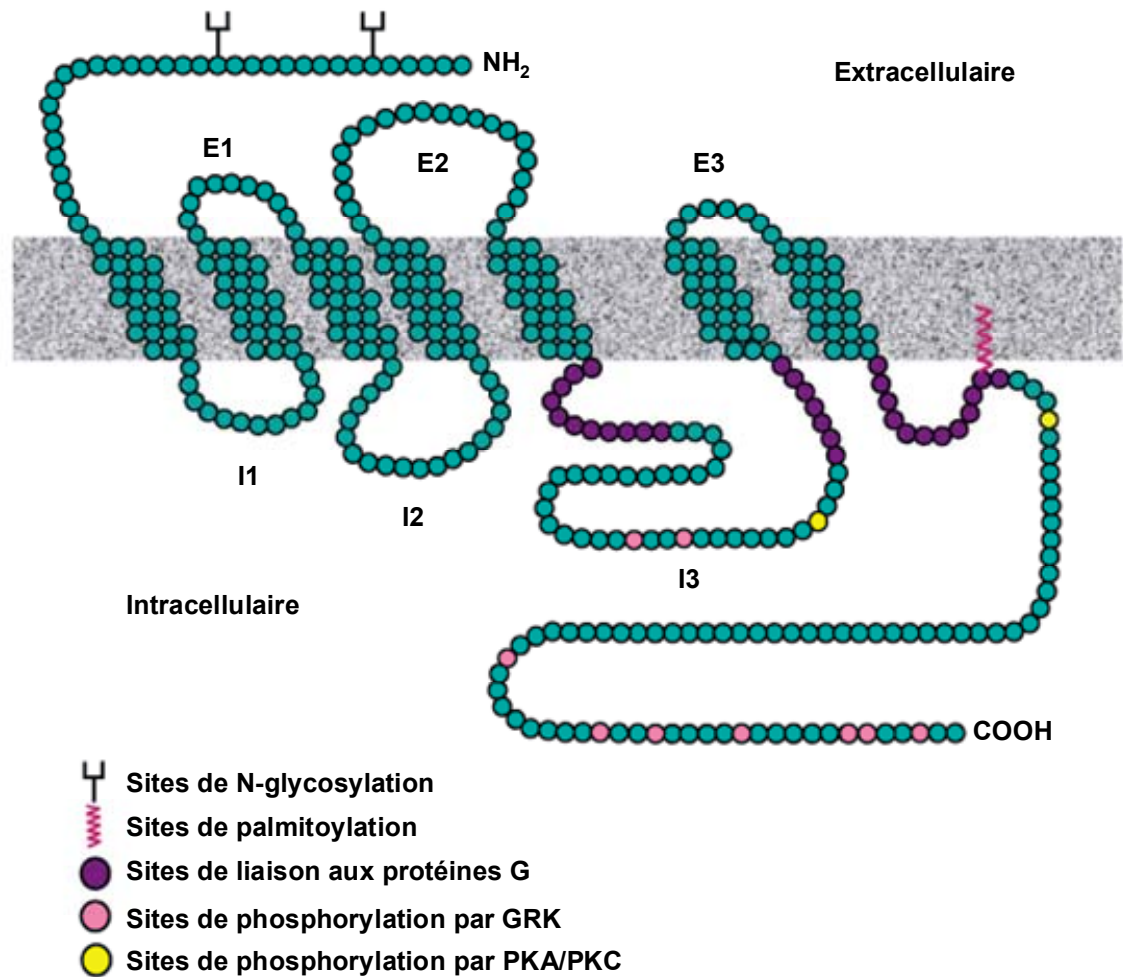


Figure 1 : Schéma de la structure classique d'un RCPG. L'extrémité N-terminale extracellulaire (NH_2), le segment C-terminal cytoplasmique (COOH), les trois boucles extracellulaires (E1, E2 et E3) ainsi que les trois boucles intracellulaires (I1, I2 et I3) sont identifiés. Des sites de phosphorylation par des protéines kinases A (PKA), des protéines kinases C (PKC) ainsi que par des kinases des RCPG (GRK) fréquemment retrouvés sont colorés selon la légende ci-dessus. Les sites de N-glycosylation se retrouvent au niveau de l'extrémité N-terminale et les sites de palmitoylation au niveau de la terminaison C-terminale. Les régions de liaison avec les protéines G sont également colorées en mauve. Adapté de Lefkowitz, 2000.

1.1.3 Les protéines qui interagissent avec les RCPG

La liaison spécifique d'un ligand sur un RCPG occasionne un changement conformationnel de la structure du récepteur qui résulte ultimement à l'activation d'une cascade de signalisation intracellulaire (Gether, 2000; Lu et al., 2002). Il existe plusieurs protéines en interaction avec les RCPG, la protéine G étant la plus importante dans la transduction et le relais du signal à l'intérieur de la cellule (Ji et al., 1998). Certains de ces récepteurs membranaires démontrent cependant un potentiel de transduction du signal via d'autres partenaires intracellulaires (Hall et al., 1999; Rajagopal et al., 2005). Par exemple, la protéine β -arrestine est capable d'interagir directement avec les RCPG (Benovic et al., 1987) lors du processus d'internalisation via des puits recouverts de clathrine et de désensibilisation homologue des RCPG (Claing et al., 2002). Lors de son interaction avec les RCPG, la protéine β -arrestine permet également le déclenchement d'une variété de voies de signalisation via l'activation de diverses kinases : ERK, p38, JNK, AKT et phosphatidylinositol 3-kinase (PI-3K) (Lefkowitz, 2007). D'autres molécules ont également la capacité de se lier avec les RCPG notamment les protéines possédant un domaine PDZ (PSD-95/Disc-large/ZO-1 homology) (Hall et al., 1998). Une étude a démontré que les derniers résidus localisés au niveau de l'extrémité C-terminale du récepteur β_2 -adrénergique interagissent avec le domaine PDZ du facteur de régulation de l'échangeur Na^+/H^+ (NHERF) (Hall et al., 1998). En effet, le récepteur β_2 -adrénergique régule le pH intracellulaire (pHi) en modulant l'échangeur Na^+/H^+ via une interaction directe avec le NHERF. Le changement d'un seul acide aminé au niveau du segment C-terminal du récepteur β_2 -adrénergique abolit la liaison entre ce récepteur et le NHERF altérant ainsi la régulation de l'échangeur Na^+/H^+ (Hall et al., 1998). Par contre, cette mutation du récepteur β_2 -adrénergique n'occasionne aucune modification pour la liaison du récepteur avec les protéines G (Hall et al., 1998). Les protéines Homer représentent un autre type de protéine interagissant avec les RCPG (Tu et al., 1998; Xiao et al., 1998). En effet, les récepteurs glutaminergiques

mGluR1a et mGluR5 forment avec leur terminaison C-terminale un complexe naturel avec le domaine EVH (Enabled/VASP homology) des protéines Homer qui modulent les récepteurs d'inositol 1,4,5-trisphosphate (IP₃) localisés au niveau du réticulum endoplasmique. Bref, ce complexe entre les protéines Homer et les récepteurs glutaminergiques représente un nouveau mécanisme de régulation du calcium (Ca²⁺) intracellulaire (Tu et al., 1998; Xiao et al., 1998).

1.1.4 Les protéines G

Comme mentionné ci-haut, les effecteurs principaux des RCPG correspondent aux protéines G hétérotrimériques (Gilman, 1987) composées de trois sous-unités α , β et γ (Lambright et al., 1996; Wall et al., 1995). Ces protéines sont ancrées à la membrane plasmique au niveau cytosolique et sont en interaction directe avec les RCPG. Lors de la modification structurale et de l'activation des RCPG par un ligand, la sous-unité α , une GTPase, est stimulée et échange sa guanosine diphosphate (GDP) pour une guanosine 5'-triphosphate (GTP) (Gilman, 1987). La liaison du GTP provoque un changement conformationnel de la sous-unité α qui lui permet de se détacher du dimère $\beta\gamma$, ce duo étant indissociable (Neer, 1995). Cette séparation permet alors à la sous-unité α et à ce dimère d'interagir avec des messagers secondaires. Il existe une grande diversité de sous-unité α et quatre grandes classes sont distinguables (α_s/α_{olf} , α_i/α_o , α_q/α_{11} , α_{12}/α_{13}) (Neves et al., 2002). Voici quelques exemples classiques d'effecteurs associés aux différents isoformes de la protéine $G\alpha$: la classe α_s/α_{olf} active l'adénylate cyclase (AC), la classe α_i/α_o inhibe l'AC mais active les canaux potassiques, la classe α_q/α_{11} stimule les phospholipases C- β (PLC- β) et finalement la classe α_{12}/α_{13} active des petites protéines G par exemple Rho et RhoGEF (Neves et al., 2002). La sous-unité α a longtemps été considérée comme la composante principale engendrant une spécificité de la voie de signalisation des RCPG. À la suite d'une étude démontrant le rôle de $\beta\gamma$ sur l'activation du canal

potassique muscarinique à acétylcholine (Logothetis et al., 1987), une variété d'effecteurs pour ce dimère ont été subséquentement mis en évidence notamment les GRK, les PLC- β , les canaux ioniques, les AC et les PI3K γ (Pierce et al., 2002). Il existe une grande diversité des voies de signalisation empruntées par les RCPG puisque ces derniers sont capables d'interagir avec une seule ou plusieurs protéines G (Allgeier et al., 1997; Okamoto et al., 1991; Perez et al., 1993; Sidhu et Niznik, 2000; Stanislaus et al., 1998).

1.1.5 Les voies principales de transduction du signal des RCPG

Il existe trois voies principales de transduction du signal pour les RCPG soit via une protéine Gs capable de stimuler l'AC, soit via une protéine Gi qui inhibe l'AC et via une protéine Gq qui active la PLC- β (Gilman, 1987). L'activation de l'AC, une enzyme qui produit l'adénosine monophosphate cyclique (AMPc) à partir de l'adénosine triphosphate (ATP), engendre une augmentation de la concentration intracellulaire en AMPc. Ce second messenger active par la suite une PKA capable de phosphoryler d'autres protéines cibles (Gilman, 1987). L'activation de la protéine Gi va au contraire diminuer le niveau AMPc. La troisième voie de signalisation prédominante pour les RCPG correspond à l'activation d'une PLC- β . Cette enzyme hydrolyse le phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP₂) en IP₃ et en diacylglycérol (DAG). IP₃ est alors libéré dans le cytosol, ce qui occasionne une hausse du Ca²⁺ intracellulaire via l'ouverture des canaux calciques du réticulum endoplasmique. Le DAG reste ancré à la membrane pour ensuite activer une PKC (Gilman, 1987). Ces trois voies de signalisation demeurent les mieux caractérisées. En revanche, il est maintenant évident qu'une grande diversité de voies de signalisation est également possible (Gudermann et al., 1996; Marinissen et Gutkind, 2001) (Fig. 2, p.8).

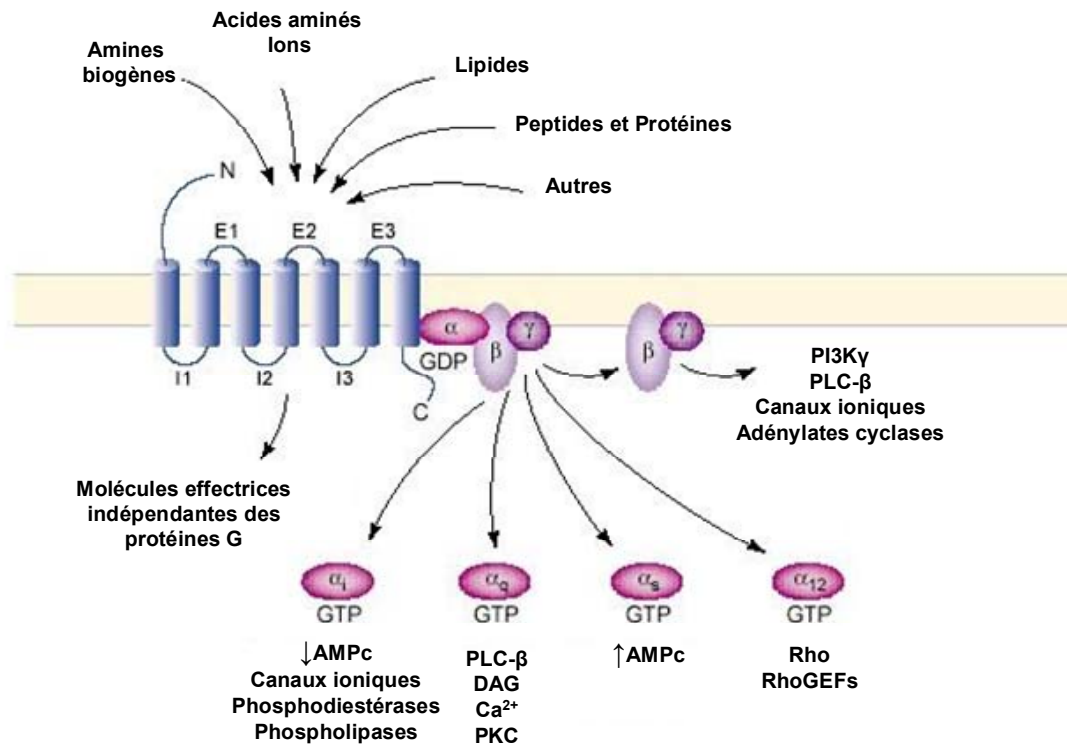


Figure 2 : Schéma des voies de signalisation via les RCPG. Une importante diversité de ligands est capable d'activer les RCPG via une modification structurale du récepteur. De manière générale, l'effecteur principal des RCPG est la protéine G, bien que d'autres molécules effectrices puissent être impliquées. L'activation de la protéine G permet à la sous-unité α d'échanger son GDP pour un GTP, ce qui permet sa dissociation avec le dimère $\beta\gamma$. Divers messagers secondaires peuvent être activés en fonction des quatre différents types de sous-unité α (α_i , α_s , α_q , $\alpha_{12/13}$) et du dimère $\beta\gamma$. Adapté de Marinissen et Gutkind, 2001.

1.1.6 La classification des RCPG

La classification fréquemment adoptée pour les RCPG est basée sur la similarité des séquences ainsi que la propriété de liaison du ligand avec le récepteur. Elle est divisée en six familles, dont trois plus prédominantes : les familles 1, 2 et 3 (Attwood et Findlay, 1994; Bockaert et Pin, 1999; Kolakowski, 1994) (Fig. 3, p.10). La famille 1, également nommée A ou « Rhodopsin-like », est considérée comme la plus prévalente et se divise en plusieurs sous-familles (Bockaert et Pin, 1999). Caractérisée par des terminaisons N-terminale et C-terminale courtes, cette famille inclut le premier RCPG à être découvert, la rhodopsine bovine (Ovchinnikov Yu, 1982). La sous-famille 1a comprend les récepteurs aminergiques incluant Spi-OAR ainsi que les récepteurs à rhodopsine servant de récepteur prototype pour cette sous-famille. Dans ce cas, l'activation se réalise lors de la liaison du ligand au niveau de la cavité formée par le TM-III et le TM-VI (Bockaert et Pin, 1999). En comparaison, la sous-famille 1b, incluant d'autres types de petites molécules peptidiques, montre une activation du récepteur lors de l'interaction du ligand avec les boucles extracellulaires E1 et E2 ainsi qu'avec la courte portion N-terminale (Bockaert et Pin, 1999). Quant à la sous-famille 1c, elle se distingue par une activation avec de grosses molécules, telles les glycoprotéines, qui se lient avec le long et volumineux segment N-terminal ainsi qu'avec les deux boucles extracellulaires E1 et E2 (Bockaert et Pin, 1999). La famille 2, appelée B ou « secretin-like », regroupe les RCPG qui sont activés au niveau du long segment N-terminal, principalement par certains peptides de grosses tailles tels le glucagon et la sécrétine (Pantaloni et al., 1996). Finalement, la famille 3 nommée C ou encore « Glutamate-like », comprenant entre autres des récepteurs métabotropiques du glutamate, est principalement caractérisée par un domaine N-extracellulaire très grand formant une cavité pour la liaison avec le ligand (Kunishima et al., 2000). Cette classification englobe également d'autres familles mineures de RCPG soit la famille D « Fungal mating pheromone receptors », la famille E « cyclic-AMP receptors » et la famille « Frizzled/Smoothed » (Kolakowski, 1994).

Il est important de noter que d'autres types de classifications ont été proposés récemment. Par exemple, le système de classification GRAFS, basé sur les liens phylogénétiques entre les RCPG, les divise en cinq grandes familles : la famille rhodopsine, la famille glutamate, la famille des récepteurs à sécrétine, la famille des récepteurs d'adhésion et la famille des récepteurs frizzled (Fredriksson et al., 2003). Cette nouvelle analyse portant sur le génome humain suggère la présence d'un ancêtre commun chez les RCPG (Fredriksson et al., 2003).

1.1.7 L'activité constitutive

Initialement, le modèle du complexe ternaire simple (Fig. 4A, p.12) met en évidence la présence d'interaction entre les RCPG, les ligands et les protéines G (De Léan et al., 1980). Selon ce modèle, la structure conformationnelle du récepteur peut se retrouver sous un état actif (Ra) ainsi que sous un état inactif (Ri). Un équilibre serait présent entre ces deux formes structurales (De Léan et al., 1980). Lors de la liaison d'un ligand sur le récepteur, un déplacement de l'équilibre serait engendré vers la forme Ra rendant alors son affinité plus forte pour la protéine G. En effet, seule la forme active du récepteur Ra détient assez d'affinité pour une liaison avec la protéine G selon ce modèle (Lefkowitz et al., 1993). De même, l'interaction avec la protéine G maintient l'affinité du récepteur pour le ligand A. Dans le cas d'agonistes complets, ces ligands sont fortement attirés par la forme Ra, ce qui engendre le déplacement de l'équilibre vers un état actif occasionnant alors l'activation d'un plus grand nombre de protéines G. Les agonistes partiels possèdent quant à eux une affinité moins importante pour la forme Ra, n'ayant pas de préférence majeure entre les formes Ra et Ri. L'effet résultant est alors de plus faible intensité comparativement aux agonistes complets. En ce qui concerne les antagonistes, ils sont capables de se lier aux deux états structuraux en bloquant le site de liaison des récepteurs.

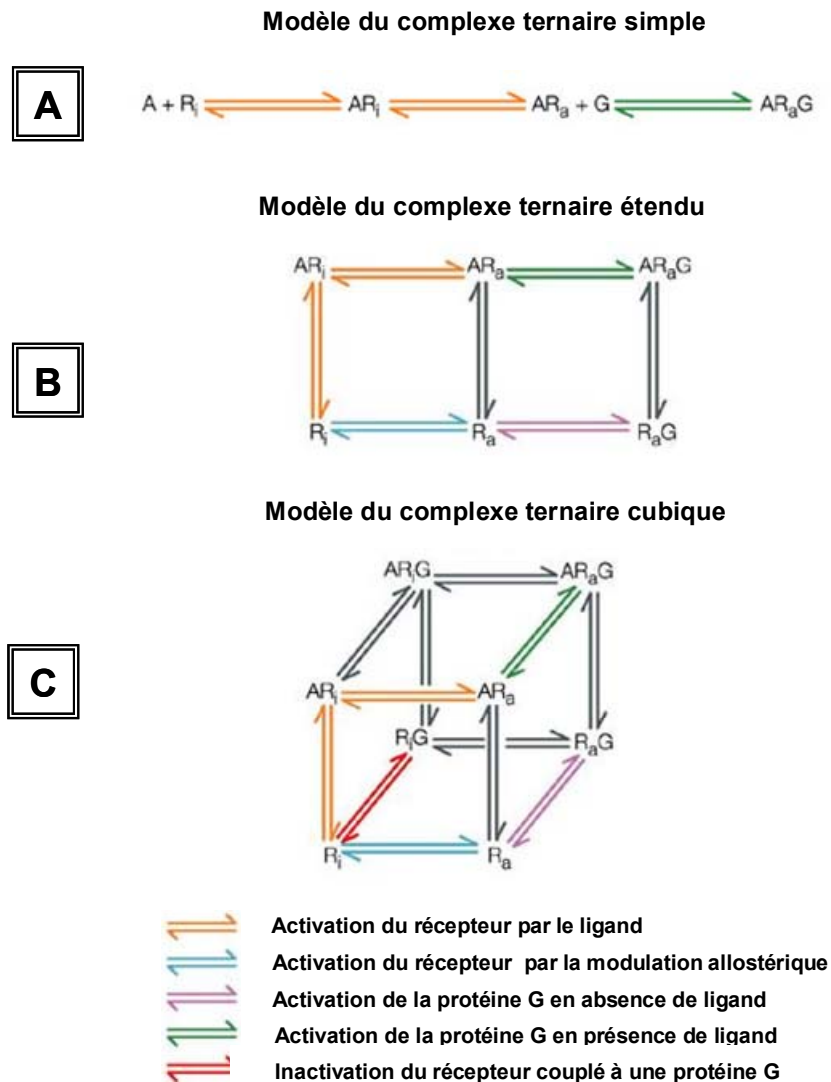


Figure 4 : Modèles du complexe ternaire. A) Modèle du complexe ternaire simple
 B) Modèle du complexe ternaire étendu C) Modèle du complexe ternaire cubique (A : Agoniste, Ri : Récepteur inactivé, Ra : Récepteur activé, G : Protéine G) Adapté de Consortium, 2004.

Le modèle complexe ternaire étendu a par la suite été élaboré (Samama et al., 1993). Il propose que le récepteur soit capable d'adopter spontanément une forme Ra et qu'il soit apte à interagir avec une protéine G, et ce, en présence ou en absence de ligand. Ce changement conformationnel spontané des récepteurs en absence de ligand correspond au phénomène d'activité constitutive des RCPG (Samama et al., 1993) qui crée un déséquilibre évident en rendant la forme Ra majoritaire (Bridges et Lindsley, 2008) (Fig. 4B, p.12). En revanche, le modèle ternaire cubique (Weiss et al., 1996) suggère une représentation thermodynamique complète de l'activation des RCPG. Il propose que la forme Ra et Ri puissent interagir avec les protéines G sans nécessairement induire un signal (Consortium, 2004). Ce modèle permet entre autre d'expliquer l'effet des agonistes inverses qui préfèrent se lier à la forme Ri en engendrant une diminution de l'activité basale du récepteur (de Ligt et al., 2000) (Fig. 4C, p.12).

En ce qui concerne l'activité constitutive, cette dernière a longtemps été considérée comme un artéfact de l'expression des récepteurs dans les systèmes hétérologues. Actuellement, cette conformation active du récepteur sans liaison avec un ligand est considérée comme un phénomène biologique naturel (Cotecchia, 2007; Milligan, 2003; Morisset et al., 2000). Certains récepteurs d'invertébrés possèdent une activité constitutive *in vitro* comme le récepteur orphelin chez *Renilla* (Bouchard et al., 2003), le récepteur à dopamine chez *Aplysia* (Barbas et al., 2006) ainsi que le récepteur à tyramine chez *C. elegans* (Rex et al., 2005) suggérant que ce phénomène se serait conservé au cours de l'évolution. La fonction biologique de l'activité constitutive n'est pas clairement établie, mais il est suggéré qu'elle jouerait un rôle dans la régulation des récepteurs (Lefkowitz et al., 1993).

1.1.8 La régulation des RCPG

Des mécanismes de désensibilisation des RCPG sont présents dans le but d'entraîner une perte de réponse suite à un stimulus constant et répété. Ce mécanisme de régulation est essentiel puisqu'il évite une stimulation excessive qui pourrait, à long terme, occasionner des effets toxiques pour la cellule. Conséquemment, ce rétrocontrôle négatif module la durée et l'intensité du signal. Lors du phénomène de désensibilisation, le récepteur subit initialement une palmitoylation sur une cystéine suivie d'une phosphorylation sur des résidus sérine-thréonine du segment C-terminal (Bouvier et al., 1988). Suite à cette phosphorylation du récepteur (Sibley et al., 1985), deux processus de désensibilisation rapides, homologue et hétérologue, sont mis en évidence. Lors d'une désensibilisation homologue, les RCPG sous forme activée et liés à leur ligand sont phosphorylés spécifiquement par une GRK rendant ainsi la conformation structurale du récepteur plus stable et altérant par conséquent le couplage de la protéine G avec le récepteur (Scott et al., 2004). Cela est suivi par le recrutement des β -arrestines (Benovic et al., 1987) qui provoque une désensibilisation fonctionnelle du récepteur et favorise le processus d'endocytose par la formation de puits recouverts de clathrine (Scott et al., 2004) (Fig. 5, p.15). Ces récepteurs sont rapidement ou lentement recyclés vers la membrane ou simplement dégradés dans les lysosomes (Pierce et Lefkowitz, 2001). En revanche, le mécanisme de désensibilisation hétérologue est déclenché lorsque le messenger secondaire active une PKA qui phosphoryle tous les récepteurs sous forme activée ou non activée par le ligand. Plusieurs études s'attardent sur les mécanismes de régulation des RCPG, une étape-clé importante dans la compréhension de ces récepteurs tels que revus dans ces articles (Bohm et al., 1997; Claing et al., 2002; Ferguson, 2001; Koenig et Edwardson, 1997; Lefkowitz et Shenoy, 2005; Pierce et al., 2002; Scott et al., 2004).

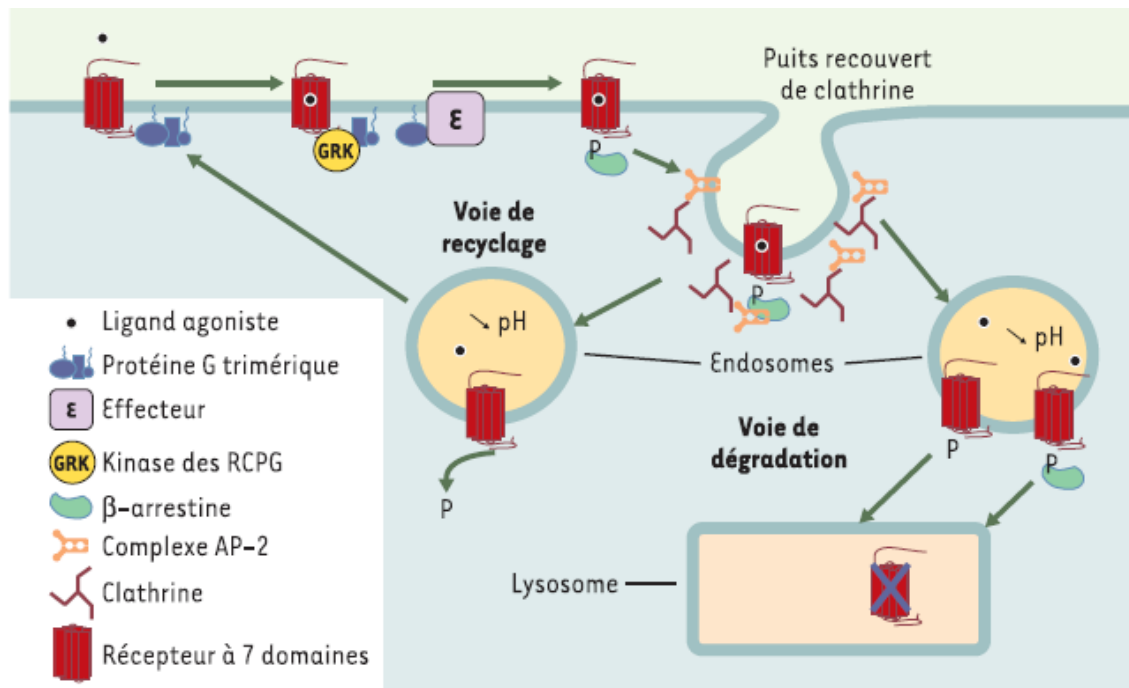


Figure 5 : Mécanisme de désensibilisation homologue et d'internalisation des RCPG. Suite à une stimulation du ligand, un GRK phosphoryle le récepteur afin de le désensibiliser. La protéine β -arrestine se lie au récepteur désensibilisé par la phosphorylation et un mécanisme d'internalisation est induit via un puits recouvert de clathrine. Au niveau des endosomes, les récepteurs suivent soit la voie de recyclage en retournant à la membrane soit la voie de dégradation dans les lysosomes. Adapté de Scott et al., 2004.

1.2 L'octopamine (OA)

1.2.1 Les fonctions

L'OA [2-amino-1- (4-hydroxyphényl) éthanol] est une phénolamine qui est synthétisée suite à une β -hydroxylation à partir de la tyramine, grâce à l'enzyme tyramine- β -hydroxylase (T β h) (Roeder, 1999) (Fig. 6, p.17). L'OA qui agit essentiellement via ses RCPG spécifiques possède un rôle majeur chez les invertébrés et ses fonctions physiologiques de neurohormone, neurotransmetteur et neuromodulateur sont similaires à l'adrénaline et à la noradrénaline chez les vertébrés (Roeder, 2003). Cette amine biogène est principalement restreinte aux invertébrés et est retrouvée sous forme de trace sans fonction précise chez les vertébrés (Borowsky et al., 2001). Plusieurs recherches permettent de bien établir les rôles fonctionnels de l'OA chez les insectes et, de façon un peu moindre, chez les mollusques. Cette molécule a été découverte pour la première fois dans les glandes salivaires postérieures de la pieuvre (*Octopus vulgaris*), sans pour autant que sa présence ne soit fonctionnellement expliquée (Erspamer et Boretti, 1951). Quelques années plus tard, la mise en évidence d'un rôle biologique de l'OA dans les tissus neuronaux a été suggéré, et ce, suite à une élévation de l'AMPc lors de l'application d'une faible concentration d'OA sur des homogénats et des préparations tissulaires de ganglions thoraciques chez la blatte (*Periplaneta americana*) (Nathanson et Greengard, 1973). Suite à cette expérimentation, la présence dans les ganglions thoraciques du premier récepteur à OA (OAR) a par conséquent été proposée. Plusieurs neurones octopaminergiques ont par la suite été identifiés chez l'aplysie (*Aplysia californica*) suggérant un rôle important de l'OA comme neurotransmetteur chez les mollusques (Axelrod et Saavedra, 1977). D'ailleurs, différentes études ont également observé une forte concentration d'OA dans les tissus neuronaux et non neuronaux chez divers invertébrés tels que les arthropodes, les mollusques, les annélides et les nématodes (David et Coulon, 1985).

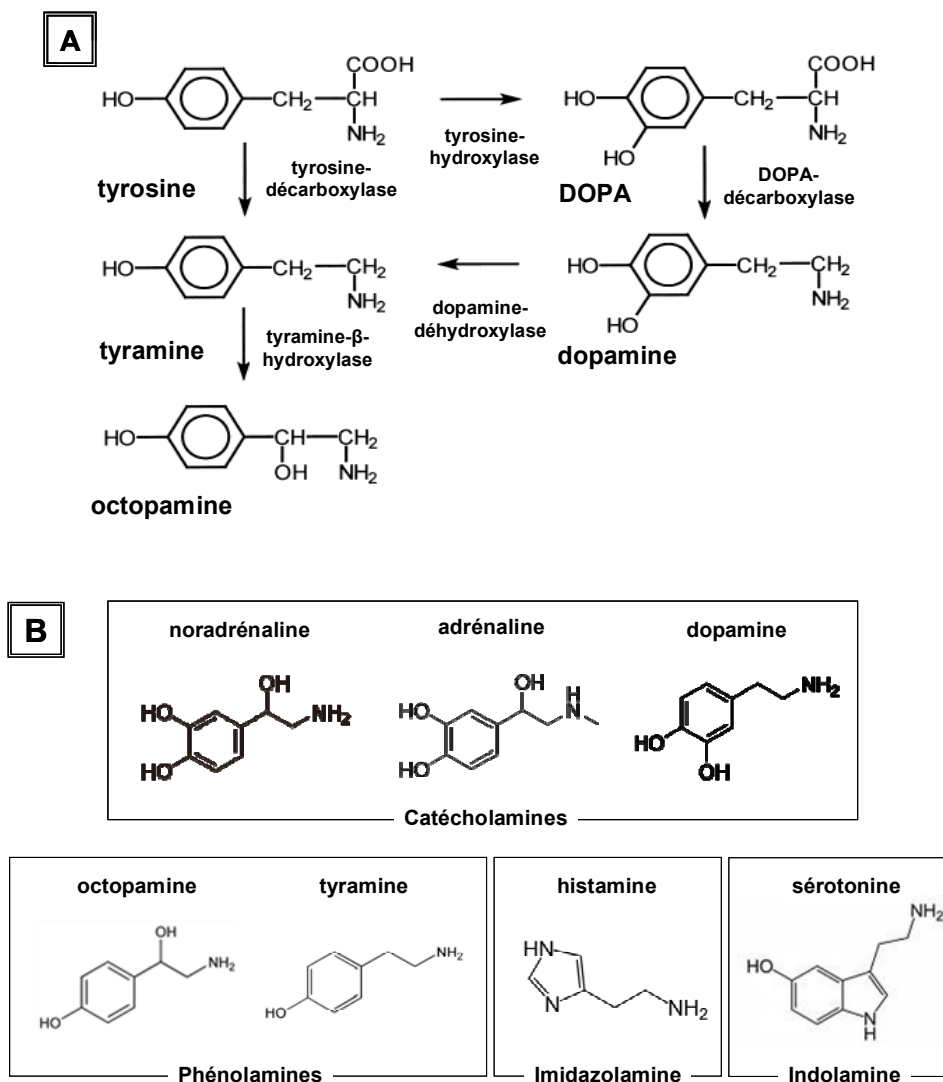


Figure 6 : Biosynthèse de l'OA. A) Voie de synthèse de l'OA. B) Exemples des structures chimiques pour certaines amines biogènes ayant des implications biologiques majeures comme neurotransmetteurs, neuromodulateurs et neurohormones. Adapté de Roeder, 1999.

Depuis, une variété d'implications physiologiques modulatrices chez les invertébrés a pu être associée à l'OA au niveau des comportements, des réponses aux phéromones, de l'apprentissage, de la mémorisation, du métabolisme des glucides, de l'activité des hémocytes et de la régulation des organes périphériques et sensoriels (Roeder, 1999; Roeder, 2005). Voici quelques exemples de fonctions biologiques de l'OA pour différents insectes fréquemment utilisés comme modèle d'étude. Chez la locuste (*Schistocerca americana gregaria*), un neurone octopaminergique module le rythme myogénique (Evans et O'Shea, 1978) et l'OA a des effets sur la performance des contractions musculaires lors du vol (Malamud et al., 1988). Chez l'abeille (*Apis mellifera*) une voie octopaminergique module la consolidation des composantes de la mémoire olfactive (Farooqui et al., 2003). Chez la drosophile (*Drosophila melanogaster*), l'OA est impliquée dans les comportements d'agression (Hoyer et al., 2008; Zhou et al., 2008) et dans la régulation du sommeil (Crocker et Sehgal, 2008). Le rôle de l'OA chez les mollusques est peu connu, les fonctions de cette amine biogène sont comparativement bien documentées chez les crustacés et les insectes. Chez le lymné (*Lymnea stagnalis*), deux rôles fonctionnels pour l'OA sont mis en évidence chez ce mollusque par exemple, des neurones octopaminergiques buccaux permettent la modulation du comportement alimentaire du lymné (Vehovszky et al. 1998) et l'OA stimule la locomotion de ce gastéropode (Ormshaw et Elliott, 2006).

1.2.2 Les rôles de l'OA en reproduction

Plusieurs études démontrent que l'OA est impliquée dans la reproduction de certains insectes tels que la drosophile (*Drosophila melanogaster*) et la locuste (*Locusta migratoria*). Par exemple, des drosophiles avec une mutation nulle « knock-out » pour le gène T β h montrent une absence de l'enzyme T β h responsable de la conversion de la tyramine en OA (Monastirioti, 2003; Monastirioti et al., 1996). Cette mutation nulle occasionne par conséquent l'arrêt de la biosynthèse de l'OA et ces

drosophiles mutantes « dépourvues d'OA » vivent jusqu'à l'âge adulte sans malformation morphologique externe majeure (Monastirioti et al., 1996). Par contre, ces femelles présentent un phénotype de stérilité dû à un blocage des ovocytes matures dans les ovaires (Monastirioti et al., 1996). Cette absence d'OA engendre une inhibition de l'expulsion des ovocytes potentiellement liée à une incapacité des muscles de l'oviducte à se contracter (Monastirioti, 2003). D'autres expériences ont également permis de démontrer l'existence d'une population de cellules neuronales octopaminergiques au niveau du ganglion abdominal des aires thoracico-abdominales (TAG) du système nerveux central chez la drosophile. Les projections du TAG innervent les ovaires, l'oviducte et les organes d'entreposage du sperme (Middleton et al., 2006; Rodriguez-Valentin et al., 2006). Chez les drosophiles stériles et mutantes pour le gène *Tβh*, l'expression de l'enzyme *Tβh* au niveau des neurones octopaminergiques du TAG permet de rétablir la fertilité des femelles (Monastirioti, 2003). Lors d'expérimentations *in situ* sur certains organes du système reproducteur de la drosophile, l'application directe d'OA engendre la contraction des muscles de l'ovaire et, inversement, inhibe la contraction des muscles de l'oviducte (Middleton et al., 2006; Rodriguez-Valentin et al., 2006). Tous ces résultats suggèrent qu'il existe des OAR au niveau des muscles de l'ovaire et de l'oviducte chez la drosophile qui occasionnent des effets opposés pour la contraction musculaire.

Parallèlement, une étude a permis de caractériser un nouveau récepteur nommé « octopamine receptor in mushroom bodies » (OAMB) chez la drosophile. En condition *in vitro* et exprimé dans des lignées cellulaires hétérologues, le récepteur OAMB engendre une élévation du Ca^{2+} intracellulaire et une hausse d'AMPc suite à une stimulation avec de l'OA (Han et al., 1998). Lors d'une étude ultérieure, il a été suggéré que cette hausse d'AMPc soit un effet indirect non physiologique induit par de fortes concentrations d'OA (Balfanz et al., 2005). Le récepteur OAMB, retrouvé sous deux isoformes, OAMB-AS et OAMB-K3, semble être exprimé dans le système reproducteur femelle ainsi qu'au niveau des ovocytes matures (Lee et al., 2003). Les

gènes K3 et AS chez l'adulte sont transcrits au niveau du cerveau, du TAG et du système reproducteur (Lee et al., 2003). Les femelles « knock-out » dont les gènes pour les deux isoformes d'OAMB ont été neutralisés montrent une viabilité sans malformation anatomique (Lee et al., 2003). Il s'avère cependant que ces femelles présentent un phénotype de stérilité comparable aux femelles mutantes pour l'enzyme T β h, et ce, avec un blocage de la relâche des ovocytes matures dans les ovaires (Lee et al., 2003). Ces résultats appuient une seconde fois l'idée que l'OA est impliquée dans la régulation de la reproduction notamment lors de l'ovulation chez la drosophile, et ce, en facilitant le passage des ovocytes de l'ovaire vers l'oviducte via des récepteurs spécifiques (Lee et al., 2003). L'investigation des fonctions d'OAMB *in vivo* a été réalisée suite à des manipulations transgéniques de l'expression de ce récepteur selon un système binaire GAL/UAS (Lee et al., 2009). Ces résultats suggèrent que l'expression d'OAMB dans le système nerveux n'est pas suffisante pour réinstaurer l'ovulation chez les femelles mutantes nulles OAMB. C'est plutôt l'expression d'OAMB dans l'épithélium de l'oviducte qui permet la restauration de l'ovulation via une élévation du Ca²⁺ intracellulaire et de l'activation de la protéine kinase II calmoduline-dépendante (CaKMII) et non via une élévation de l'AMPc (Lee et al., 2009). Le modèle général proposé lors de cette dernière étude (Lee et al., 2009) suggère que la copulation active les neurones octopaminergiques du TAG dont les projections innervent l'épithélium de l'oviducte où se localise le récepteur OAMB. Lors de l'activation d'OAMB avec de l'OA, la voie Ca²⁺/CaKMII est stimulée déclenchant alors des sécrétions dans la lumière de l'oviducte qui facilitent le transport des ovocytes (Lee et al., 2009). De plus, l'OA agirait sur un second récepteur, non caractérisé à ce jour, situé au niveau des muscles de l'oviducte, qui permettrait une relaxation musculaire. La synchronisation de la contraction des muscles de l'ovaire et de la relaxation musculaire de l'oviducte seraient indispensables pour le bon fonctionnement de l'ovulation chez la drosophile (Lee et al., 2009).

En outre, la création d'un modèle de drosophile mutante présentant une neutralisation pour le gène *dTdc2* codant pour l'enzyme tyrosine décarboxylase (TCD) neuronale qui permet la transformation de la tyrosine en tyramine montre une absence de tyramine et d'OA neuronale (Cole et al., 2005). Ces drosophiles présentent un phénotype de stérilité dû à une absence d'oviposition avec une ovulation tout à fait fonctionnelle puisque plusieurs ovocytes se retrouvent au niveau des oviductes (Cole et al., 2005). L'ovulation chez la drosophile est définie comme étant le passage des ovocytes des ovarioles postérieurs aux oviductes latéraux (Cole et al., 2005) ; comparativement l'oviposition est définie comme étant l'expulsion des ovocytes dans la région du système reproducteur femelle où se terminent l'oviducte commun et les canaux spermathécaux (Cole et al., 2005). Chez les femelles « knock-out » Tbh décrites précédemment, les ovocytes sont complètement retenus dans les ovaires démontrant alors un déficit de l'ovulation sans véritablement savoir si cette mutation affecte également l'oviposition (Monastirioti, 2003; Monastirioti et al., 1996). Ces études montrent qu'il existe deux phénotypes spécifiques de stérilité pour les femelles drosophiles dépourvues d'OA affectant différemment le fonctionnement du système reproducteur femelle (Cole et al., 2005; Monastirioti, 2003; Monastirioti et al., 1996).

Également, l'OA est impliquée au niveau du système reproducteur chez la locuste. Certaines études démontrent que l'OA induit des effets opposés au niveau musculaire chez la locuste en induisant une relaxation des muscles de l'oviducte (Nykamp et Lange, 2000; Orchard et Lange, 1985) via une élévation de l'AMPc (Lange et Orchard, 1986) et en engendrant une contraction des muscles de la spermathèque (Clark et Lange, 2003). La caractérisation d'un nouveau récepteur à tyramine/octopamine (Molaei et al., 2005) exprimé au niveau de l'oviducte suggère qu'il possède un rôle potentiel en ce qui concerne les contractions musculaires de l'oviducte. De plus, l'OA a été identifiée chez la locuste au niveau des ganglions abdominaux VII et VIII ainsi qu'au niveau du nerf ventral ovipositeur innervant la

spermathèque (Clark et Lange, 2003). Lors de l'application d'OA sur les muscles de la spermathèque, une augmentation dose-dépendante de la fréquence des contractions musculaires et de l'amplitude des contractions neurogéniques est notée (Clark et Lange, 2003). Une élévation du niveau d'AMPc est observable dans toutes les régions de la spermathèque et particulièrement au niveau du sac spermathécal où l'élévation est la plus importante (Clark et Lange, 2003). Ces résultats suggèrent un rôle potentiel de l'OA dans la modulation des contractions musculaires de la spermathèque, essentielles pour le mouvement des spermatozoïdes vers la chambre génitale chez la locuste (Clark et Lange, 2003). La réussite de la fécondation chez cet insecte reposerait essentiellement sur la coordination des contractions musculaires de la spermathèque et de l'oviducte d'où le rôle majeur de l'OA dans sa reproduction.

1.2.3 Les récepteurs à OA

L'OA exerce une multitude de fonctions via l'activation de RCPG spécifiques et certains de ces récepteurs ont été caractérisés non seulement chez la drosophile, mais également chez d'autres espèces d'insectes (Evans et Maqueira, 2005). On dénombre seulement quatre récepteurs à OA caractérisés chez les mollusques. Le récepteur Lym oa₁ de 638 acides aminés est un OAR cloné et séquencé à partir des ADNc isolés du système nerveux du gastropode *Lymnaea stagnalis* (Gerhardt et al., 1997a). Lors de la comparaison de la séquence en acides aminés, il est possible d'observer un fort pourcentage d'identité (30-40 %) de Lym oa₁ avec un récepteur à tyramine/octopamine de drosophile, avec un récepteur à tyramine de locuste et avec les récepteurs α 2-adrénergique de vertébrés (Gerhardt et al., 1997a). L'expression fonctionnelle de Lym oa₁ dans les cellules rénales embryonnaires humaines (HEK 293) indique que ce récepteur possède une forte affinité pour l'OA comparativement à la tyramine et à l'adrénaline. De plus, l'OA est le meilleur agoniste pour Lym oa₁ capable de déclencher l'activation de l'AC et de la PLC- β (Gerhardt et al., 1997a).

Également, l'OAR, Lym oa₂ de 578 acides aminés, a été cloné et séquencé à partir des ADNc isolés du système nerveux du même gastropode (Gerhardt et al., 1997b). La comparaison de la séquence en acides aminés indique un fort pourcentage d'identité (45%) avec Lym oa₁. Curieusement, Lym oa₂ n'engendre aucune fluctuation d'AMPc ou de phosphatidylinositol (PI) (Gerhardt et al., 1997b). Précisément, l'application de l'OA sur des cellules transfectées avec Lym oa₂ engendre plutôt un courant chlorique voltage indépendant (Gerhardt et al., 1997b). Finalement, un OAR (Ap oa₁) a été cloné et séquencé chez *Aplysia californica* et *Aplysia kurodai*, à partir d'une librairie d'ADN génomique et d'une librairie d'ADNc pour les muscles accessoires de la fermeture de la radula (Li et al., 1995). Ce RCPG provenant de deux espèces différentes d'aplysie codent pour 394 acides aminés et ces deux homologues montrent 94 % d'identité (Chang et al., 2000). Les expériences indiquent que le récepteur Ap oa₁ se couple à l'AC et n'active pas la PLC- β (Chang et al., 2000).

Les OAR peuvent agir via différents types de G α . De manière générale, la voie de signalisation prédominante des OAR comme Ap oa₁ (Chang et al., 2000), DmOct β 1R, DmOct β 2R et DmOct β 3R (Evans et Maqueira, 2005) se réalise essentiellement avec les RCPG en activant une protéine Gs. Cependant, on retrouve un OAR, K50Hel (von Nickisch-Rosenegk et al., 1996), qui inhibe l'AC via une protéine Gi. De plus, certains OAR tels Lym oa₁ (Gerhardt et al., 1997a) et Pa oa₁ (Bischof et Enan, 2004) sont caractérisés par une activation double basée sur une activation de l'AC et de la PLC- β . Finalement, un seul OAR, Lym oa₂ (Gerhardt et al., 1997b), a démontré un couplage avec des canaux chloriques.

1.2.4 La classification des récepteurs à OA

Les OAR ont initialement été classifiés en deux groupes selon la réponse physiologique induite par l'application d'OA sur des préparations neuromusculaires

du muscle extenseur tibial de locuste. Les OAR de classe 1 sont associés à une élévation du Ca^{2+} et ceux de classe 2 à une élévation de l'AMPc (Evans, 1981; Evans et Robb, 1993). Sur la base de différenciations pharmacologiques, la classe 2 a ensuite été scindée en deux sous-groupes A et B. Par exemple, la classe 2A est particulièrement caractérisée par des antagonistes fortement sélectifs comme la métoclopramide, la miansérine et le cyproheptadine ainsi que par des agonistes comme la naphazoline qui est meilleur que la tolazoline. Plus tardivement, la classe Octopamine-3 a été proposée afin de regrouper tous les OAR localisés au niveau du système nerveux et couplés à une augmentation d'AMPc (Roeder, 1999). Récemment, suite aux progrès en biotechnologie, plusieurs révisions de la classification des OAR ont été proposées selon la pharmacologie ainsi que la voie de signalisation des récepteurs. De nouvelles classifications mettent principalement l'accent sur l'homologie de la séquence avec les sous-types de récepteurs adrénergiques des vertébrés. Les deux classifications récemment proposées pour les OAR basées sur deux méthodes d'analyse phylogénétique différentes sont résumées dans les tableaux I (p.25) et II (p.26). Ces analyses phylogénétiques ne parviennent cependant pas exactement aux mêmes conclusions et, par conséquent, la classification des OAR est sujette à d'éventuelles révisions et la caractérisation de nouveaux OAR chez les invertébrés s'avère donc primordiale pour des modifications futures. Dans le tableau I, le groupe appelé « *Aplysia* octopamine receptors » rassemble des récepteurs dont la voie de signalisation reste à déterminer. Cette classe est nommée «Octopamine β -adrenergic-like receptors» dans le tableau II incluant cette fois-ci des récepteurs caractérisés (Ap oa1, DmOct β 1R, DmOct β 2R et DmOct β 3R) et possédant une signalisation exclusive via une augmentation de l'AMPc sans élévation du Ca^{2+} intracellulaire. Dans la classification de Roeder, les récepteurs diminuant l'AMPc possèdent comme groupe sœur les récepteurs α -2-adrénergiques humains ce qui n'est pas le cas dans la classification de Evans-Maqueira. Dans les deux classifications, le récepteur Lym oa2 (Gerhardt et al., 1997b) qui induit un courant chlorique ne possède aucun homologue avec les récepteurs adrénergiques de vertébré.

Tableau I : Classification des OAR selon Roeder. Ce tableau est un résumé de la classification des récepteurs à OA et à tyramine selon une analyse phylogénétique des régions conservées et incluant à des fins comparatives des récepteurs adrénergiques de vertébrés. Résumé de Pflüger et Stevenson, 2005 ; Roeder, 2005.

Classes	Voies	Groupes sœurs adrénergiques	Exemples de récepteurs
« octopamine receptors »	↑AMPC	α -1 adrénergique	AmOAR1 (Grohmann et al., 2003) OAMB (Han et al., 1998) Lym oa1 (Gerhardt et al., 1997a)
« <i>Aplysia</i> octopamine receptors »	---	β - adrénergique	Ap oa1 (Chang et al., 2000) DmOct β 3R (Maqueira et al., 2005)
« tyramine receptors »	↓AMPC	α -2 adrénergique	K50Hel (von Nickisch-Rosenegk et al., 1996)
«Lymnaea type II octopamine receptors »	Courant Cl ⁻	---	Lym oa2 (Gerhardt et al., 1997b) Tyra-2 (Rex et al., 2005)

Tableau II : Classification des OAR selon Evans et Maqueira. Ce tableau est un résumé de la classification des récepteurs à OA et à tyramine basée sur une analyse phylogénétique et incluant à des fins comparatives des récepteurs adrénergiques de vertébrés. Résumé de Evans et Maqueira, 2005 ; Maqueira et al., 2005.

Classes	Voies	Groupes sœurs adrénergiques	Exemples de récepteurs
« Octopamine α -adrenergic-like receptors»	$\uparrow \text{Ca}^{2+}$ $\uparrow \text{AMPc}$	α -adrénergique	AmOAR1 (Grohmann et al., 2003) OAMB (Han et al., 1998) Lym oa1 (Gerhardt et al., 1997a) Pa oa1 (Bischof et Enan, 2004)
« Octopamine β -adrenergic-like receptors»	$\uparrow \text{AMPc}$	β -adrénergique	Ap oa1 (Chang et al., 2000) DmOct β 1R, DmOct β 2R, DmOct β 3R (Maqueira et al., 2005)
« Octopamine/tyramine receptors »	$\downarrow \text{AMPc}$	---	K50Hel (von Nickisch-Rosenegk et al., 1996) Amtyr1 (Blenau et al., 2000)
---	Courant Cl^-	---	Lym oa2 (Gerhardt et al., 1997b)

1.2.5 La tyramine

Différant seulement par un groupement hydroxyle, la structure moléculaire de la tyramine ressemble énormément à celle de l'OA (Fig. 6, p.17). La double activation de certains récepteurs à octopamine/tyramine (Molaei et al., 2005; Robb et al., 1994) permet d'ouvrir un débat à savoir si ces récepteurs sont réellement activés par ces deux amines biogènes *in vivo* ou par une seule de ces deux molécules actives (Robb et al., 1994). Selon certaines localisations cellulaires et tissulaires du récepteur, ces derniers pourraient être préférentiellement activés par l'OA et selon d'autres emplacements, ces récepteurs seraient activés par la tyramine. Cette dernière a longtemps été perçue comme étant un précurseur sans implication biologique. Actuellement, plusieurs études supportent l'idée que cette amine agit comme une molécule active indépendante tout en jouant également son rôle de précurseur. Par exemple, la tyramine possède un rôle de neuromodulateur au niveau des jonctions neuromusculaires (Nagaya et al., 2002) et de régulateur de la perméabilité chlorique des tubules de Malpighi chez la drosophile (*Drosophila melanogaster*) (Blumenthal, 2003). Chez la locuste (*Locusta migratoria*), elle serait un neurotransmetteur au niveau des muscles de l'oviducte (Lange, 2004) et des muscles de la spermathèque (da Silva et Lange, 2008). Le rôle biologique de la tyramine comme molécule chimique active est également fortement appuyé par le clonage et la caractérisation de plusieurs récepteurs à tyramine (Blenau et al., 2000; Saudou et al., 1990; Vanden Broeck et al., 1995) suggérant fortement que la tyramine agirait comme neuromodulateur/neurotransmetteur/neurohormone via des RCPG exclusifs (Lange, 2009b).

1.3 La palourde *Spisula solidissima*

1.3.1 *Le modèle animal*

La palourde (*Spisula solidissima*) est un mollusque bivalve de la famille des *Macridea* qui vit sur le plateau continental du Golfe du Saint-Laurent jusqu'en Caroline du Nord au Cap Hatterras (Merrill et Ropes, 1969). Au cours de ce projet, les spécimens ont spécifiquement été pêchés aux Iles-de-la-Madeleine (Québec, Canada). Il existe plusieurs avantages à l'utilisation de cet invertébré dans le domaine de la reproduction puisqu'il a été utilisé dans plusieurs études portant sur la fécondation et la gamétogénèse. En effet, la grande quantité de gamètes, d'ovocytes et de spermatozoïdes, disponibles est très favorable lors des expériences puisque cela permet d'obtenir un grand nombre d'embryons au même stade. D'ailleurs, le cycle de gamétogénèse de ce mollusque bivalve a complètement été décrit (Ropes, 1968) et cet invertébré dioïque (Coe, 1943) permet d'étudier les deux sexes individuellement. Ce modèle animal pour lequel l'action de la sérotonine (5-HT) sur le système reproducteur reste la mieux connue est donc approprié en ce qui concerne l'investigation des interventions potentielles d'amines biogènes via leurs récepteurs respectifs.

1.3.2 *La reproduction*

Les palourdes sont unisexuées (Coe, 1943), les cas d'hermaphrodisme étant extrêmement rares et le résultat de défaillance développementale (Ropes, 1968). Le système reproducteur, dépourvu d'organes sexuels accessoires (Galtsoff, 1961), est constitué d'une paire de gonades lobulaires fusionnées par le milieu qui est localisé au niveau de la partie postérieure du pied, positionné ventralement à la cavité péricardique et à proximité du ganglion viscéral (Coe, 1943) (Fig. 7, p.29).

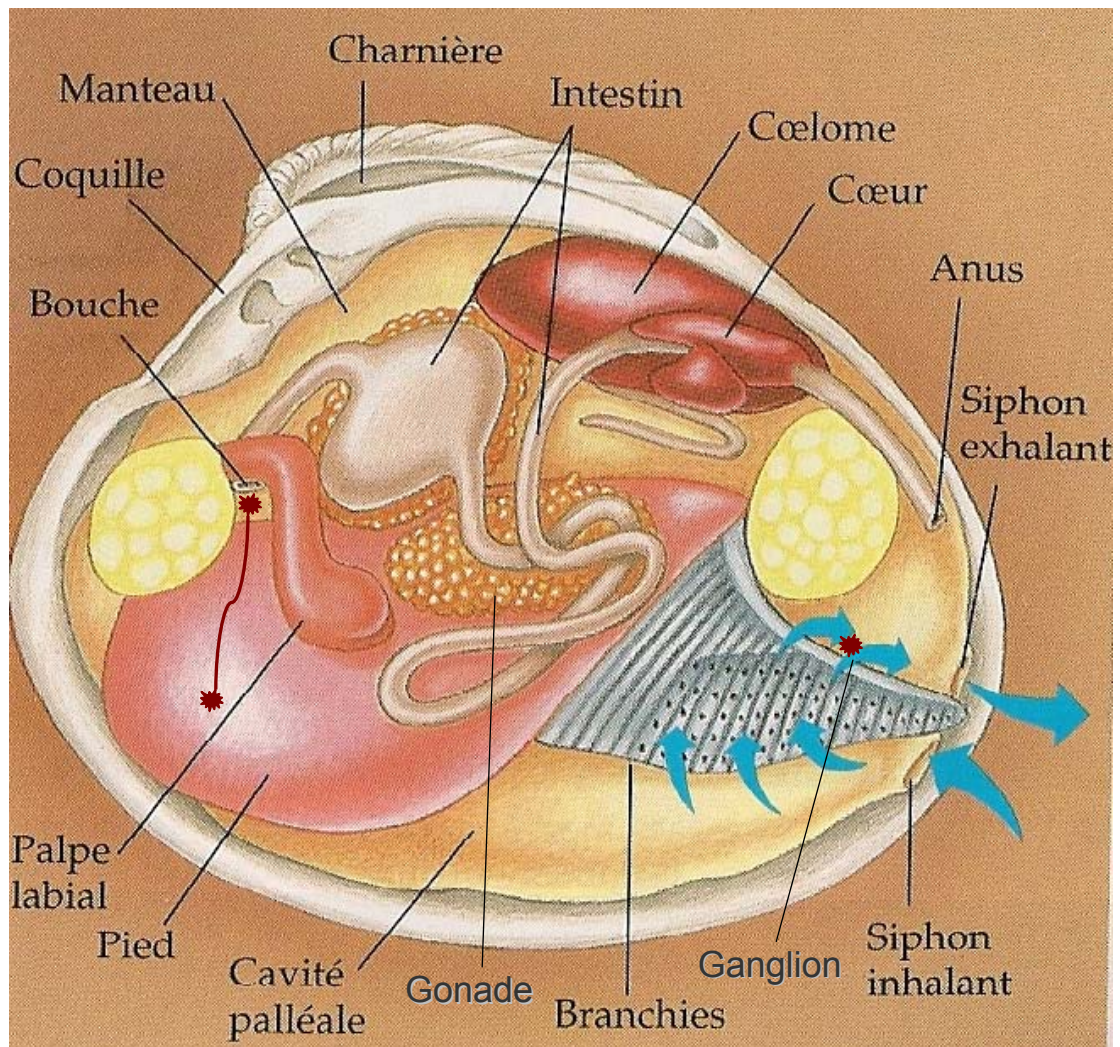


Figure 7 : Schéma représentant l'anatomie de la palourde. Les gonades ainsi que plusieurs autres organes sont identifiés. Adapté de Campbell, 1995.

Le développement des gonades primaires s'amorce par une paire de bourgeons germinaux mésodermiques qui donnent lieu à un développement d'embranchements folliculaires entourant l'intestin (Coe, 1943). Les ramifications acineuses ou folliculaires de cette arborisation s'ouvrent vers les gonoductes, une paire de canaux courts, ciliés et sans glande (Coe, 1943). Les gonoductes servent au transport des gamètes vers la cavité palléale (Galtsoff, 1961) et se terminent à l'ouverture génitale par les papilles génitales. Ces dernières étant identiques pour les deux sexes (Stickney, 1963), elles se localisent à la surface postérieure du muscle rétracteur du pied, de chaque côté de la masse viscérale. Les cellules constitutives de chaque follicule se différencient en cellules nutritives et en gonies primaires (Coe, 1943). Les gonades femelles sont généralement de couleur rosée, mais peuvent être parfois blanchâtres ressemblant ainsi aux gonades mâles. Par conséquent, la distinction exacte entre les mâles et les femelles se réalise lors d'une observation microscopique des gamètes et aucun aspect morphologique ne permet une identification des sexes chez cette espèce bivalve (Ropes, 1968). Le cycle de reproduction annuel de la palourde *Spisula* a complètement été décrit lors d'observations de coupes histologiques (Ropes, 1968) et est caractérisé par une forte ponte de la mi-juillet à octobre. Ces examens microscopiques ont permis de diviser le cycle gamétogénétique en cinq grandes phases : la phase active précoce, la phase active tardive, la phase de maturité, la phase de ponte partielle et la phase de ponte complète (Ropes, 1968). Chez la palourde, la fécondation se localise à l'extérieur des organes femelles, dans le milieu aquatique externe (Galtsoff, 1961). L'expulsion des ovocytes mûrs lors de la phase de ponte partielle ou complète se réalise grâce au courant d'eau qui entre par le siphon d'entrée, passe dans la chambre infrabranchiale autour des branchies et arrive aux papilles génitales où se situent les gamètes matures qui se font par la suite emporter vers le siphon de sortie. De plus, la ponte peut parfois être accompagnée par des contractions rythmiques des muscles abducteurs qui permettent de coller les deux valves pour faciliter l'expulsion des gamètes (Ropes, 1968). En résumé, le courant d'eau ainsi que les contractions musculaires permettent

l'expulsion des gamètes vers le milieu extérieur (Ropes, 1968). Les ovocytes matures expulsés des gonades se retrouvent en prophase I et la poursuite de la maturation méiotique ovocytaire se réalise après la ponte et la fécondation (Costello et al., 1957; Stickney, 1963) comparativement à la méiose des gamètes mâles qui se réalise à l'intérieur des gonades, les spermatozoïdes compétents se faisant expulser dans le milieu extérieur lors de la ponte saisonnière (Ropes, 1968).

1.3.3 *L'activation méiotique*

Lors de la gamétogénèse, la maturation méiotique des ovocytes est généralement arrêtée en prophase I, un stade distinguable au microscope par la vésicule germinative (GV). La rupture de cette vésicule germinative (GVBD) correspond à un indicateur clé en ce qui concerne la reprise de la méiose à partir de la prophase I facilement observable. Selon l'absence ou la présence d'un deuxième arrêt en métaphase II, deux classes d'ovocytes basées sur la progression méiotique sont identifiées chez les mollusques (Colas et Dubé, 1998). La classe 1 inclut des bivalves tels que la palourde *Spisula solidissima* ainsi que le mollusque *Barnea* possédant des ovocytes avec une maturation méiotique continue. La fécondation pour ces deux espèces se réalise en prophase I qui est suivie d'une méiose complète, de l'expulsion du premier et du second globule polaire, puis de l'entrée en mitose de l'embryon (Colas et Dubé, 1998). En revanche, la classe 2 comprend certains gastropodes comme *Patella* et certains bivalves tels *Ruditapes* et *Mytilus*. Cette deuxième classe regroupe des ovocytes arrêtés en prophase I et dont la méiose est réactivée lors d'une stimulation hormonale qui est succédée d'un second arrêt en métaphase I, et donc, avant la relâche du premier globule polaire. La poursuite de la méiose se réalise lors d'une fécondation en métaphase I qui est suivie de l'expulsion des premier et deuxième globules polaires ainsi que des autres étapes méiotiques et mitotiques (Colas et Dubé, 1998) (Fig. 8, p.32).

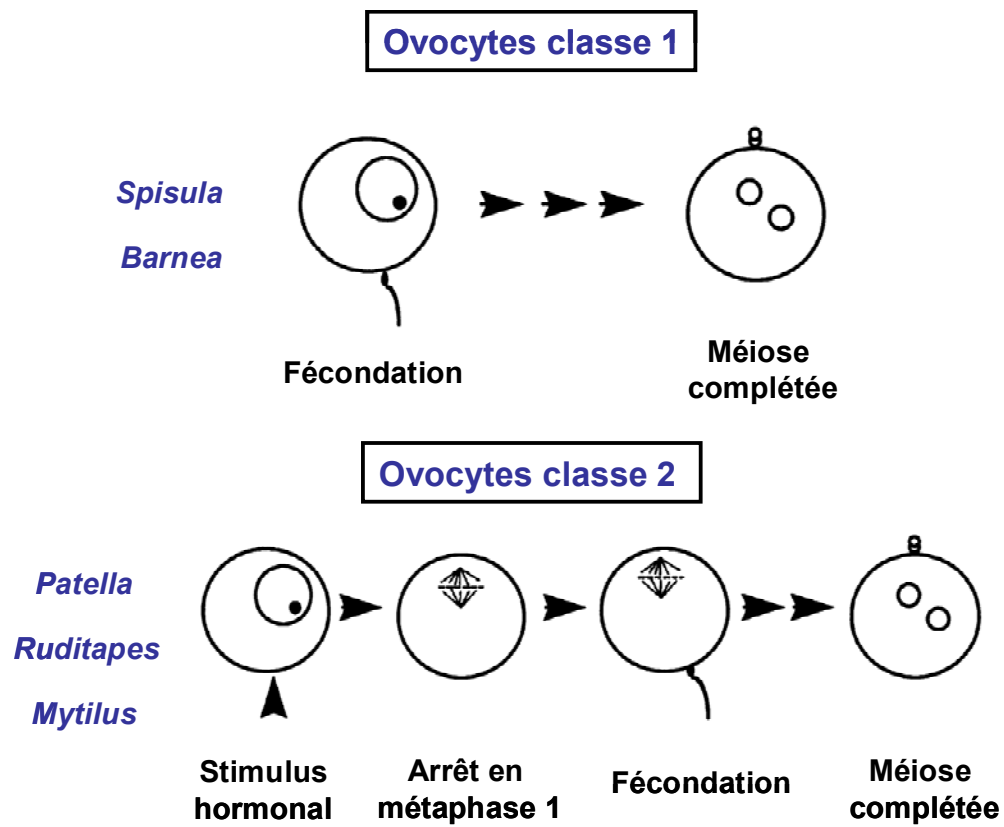


Figure 8 : Classes d'ovocytes chez les mollusques. Il existe deux classes d'ovocytes retrouvées chez les mollusques lors de la progression méiotique. Adapté de Colas et Dubé, 1998.

Évidemment, le processus d'activation et la progression méiotique varient selon les espèces étudiées. Chez les amphibiens et les mammifères, l'activation de la prophase I jusqu'en métaphase II est induite par une stimulation hormonale lors d'une augmentation en progestérone ou en hormone lutéinisante (Colas et Dubé, 1998) et la fécondation par les spermatozoïdes des ovocytes se réalise lors du deuxième arrêt en métaphase II. Plusieurs études chez la souris (Schultz et al., 1983; Vivarelli et al., 1983) et chez le xénope (*Xenopus laevis*) (Cicirelli et Smith, 1985; Maller, 1985) démontrent qu'une diminution d'AMPc est suffisante pour engendrer la reprise de la méiose. D'ailleurs, une diminution d'AMPc est observable parallèlement à la progression méiotique lors d'une stimulation des ovocytes avec l'hormone naturelle, 1-méthyl-adénine, chez les échinodermes (l'étoile de mer) (Meijer et al., 1989; Meijer et Zarutskie, 1987). En revanche, chez deux espèces de némerthes, l'activation de la méiose est déclenchée par plusieurs agents augmentant le niveau AMPc (Stricker et Smythe, 2001). En ce qui concerne la palourde *Spisula solidissima*, après l'activation des ovocytes par un spermatozoïde ou par des activateurs artificiels méiotiques connus comme la 5-HT ou le KCl, une élévation de l'AMPc est observable (Yi et al., 2002). Une régulation ionique est également impliquée chez la palourde et un influx calcique précoce suivi d'une augmentation du Ca^{2+} intracellulaire sont requis pour l'activation méiotique des ovocytes en arrêt-prophase I (Colas et Dubé, 1998). De plus, une élévation du pHi est occasionnée par l'activation d'un échangeur Na^+/H^+ (Dubé et Eckberg, 1997). Toutes ces étapes précoces de signalisation cellulaire au niveau de l'ovocyte de la palourde sont schématisées dans la figure suivante (Fig. 9, p.34). Le processus d'activation de l'ovocyte n'est pas encore complètement déterminé et deux hypothèses sont envisageables : une interaction membranaire de type ligand-récepteur par exemple via un récepteur à 5-HT ou une fusion membranaire où un activateur spermatique serait injecté dans l'ovocyte.

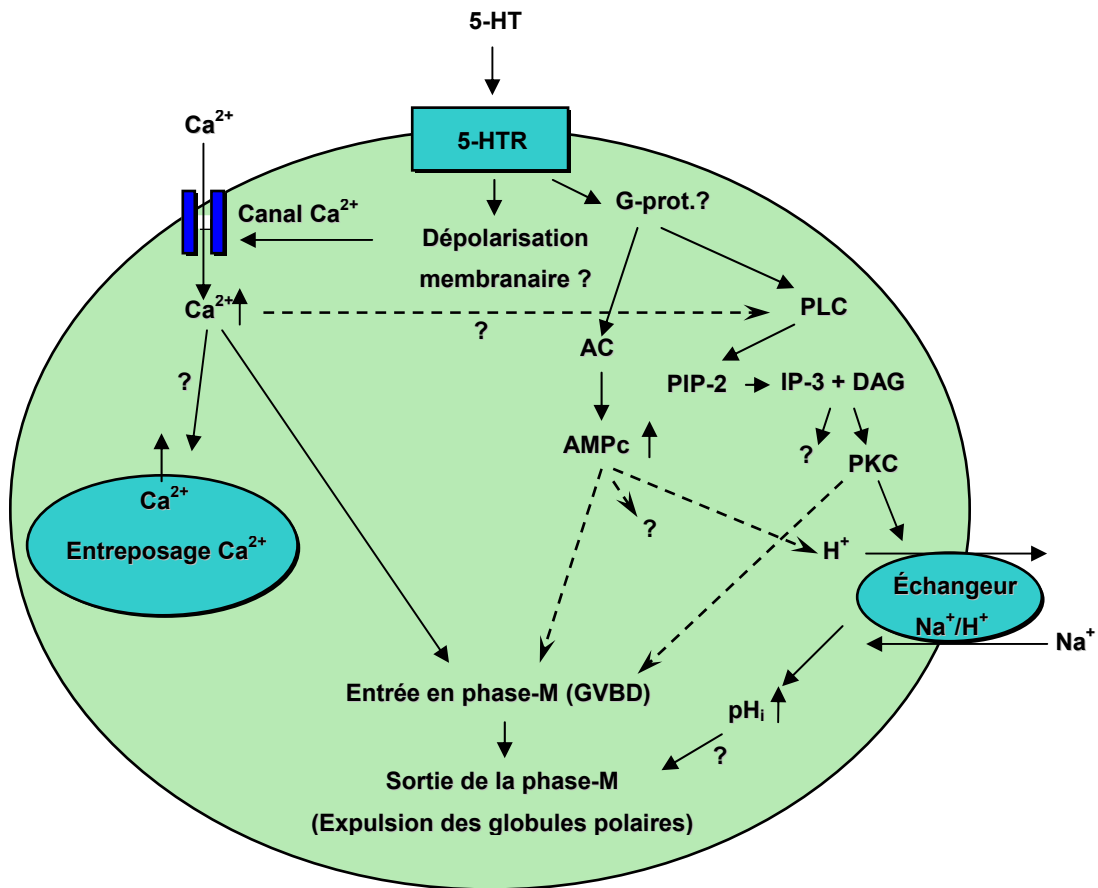


Figure 9 : Schéma d'un ovocyte de palourde et des voies de signalisation induites par la 5-HT. Représentation schématique des étapes initiales lors de la réactivation méiotique d'un ovocyte arrêté en prophase I chez la palourde *Spisula solidissima* par la 5-HT. Adapté de Colas et Dubé, 1998.

1.3.4 Les rôles de la 5-HT dans la reproduction

La 5-HT est reconnue comme un régulateur clé du système reproducteur chez diverses espèces d'invertébrés, mais aussi à un degré moindre chez plusieurs vertébrés. En s'attardant principalement à notre modèle animal, la palourde, la première démonstration de l'implication de la 5-HT dans la reproduction de ce mollusque bivalve s'observa lors du déclenchement de la ponte suite à l'injection dans les gonades matures de 5-HT (Hirai et al., 1988). Également, un réseau sérotoninergique a été localisé dans les gonades de la palourde tout juste avant la ponte (Masseau et al., 2002). L'ajout de faibles concentrations ($<500\text{nM}$) de 5-HT à des ovocytes isolés améliore la fécondation des ovocytes par les spermatozoïdes (Juneja et al., 1993). À une forte concentration ($1\text{-}10\mu\text{M}$), la 5-HT mime l'effet des spermatozoïdes et active la méiose (Juneja et al., 1993) qui est suivie d'une élévation du niveau d'AMPc intracellulaire ovocytaire (Yi et al., 2002). Des sites de liaison de la 5-HT ont été mis en évidence avec des préparations membranaires d'ovocytes et les propriétés pharmacologiques d'un récepteur potentiel ont été déterminées (Krantic et al., 1991; Krantic et al., 1993b). Toutes ces observations suggèrent qu'il existe des récepteurs sérotoninergiques à la surface des ovocytes (Krantic et al., 1993a) de la palourde permettant une régulation localisée susceptible d'influencer la réactivation méiotique, la ponte ou les étapes précoces du développement embryonnaire (Buznikov et al., 2001). Il n'est pas exclu que d'autres amines pourraient également intervenir au niveau de la reproduction chez ce mollusque, notamment l'OA qui possède un rôle majeur chez les invertébrés (Roeder et al., 2003), et notamment dans la reproduction chez les insectes tel que vu précédemment.

La 5-HT pourrait également être impliquée dans le système reproducteur des mammifères au niveau des ovaires et du tractus génital femelle. D'ailleurs, un réseau sérotoninergique autonome a clairement été identifié dans ce système (Dubé et Amireault, 2007). Au niveau des ovocytes, des cellules de granulosa, des cellules du

cumulus et des embryons précoces, plusieurs récepteurs à 5-HT ont été identifiés (5-HT_{1D}, 5-HT_{2A-B} et 5-HT₇) (Amireault et Dubé, 2005a). De plus, la 5-HT elle-même et le transporteur à 5-HT (SERT) ont été localisés dans les ovocytes et les embryons. L'enzyme tryptophane hydroxylase 1 (TPH1) a été identifiée dans les cellules du cumulus complétant ainsi tout la panoplie de joueurs clés pour former un réseau sérotoninergique autonome (Amireault et Dubé, 2005b). La présence d'un récepteur à 5-HT fonctionnel est appuyée par des études démontrant une activation de deux messagers secondaires, le Ca²⁺ et l'AMPc, au niveau des cellules du cumulus lors de la stimulation par la 5-HT (Amireault et Dubé, 2005a). De plus, des souris « knockout » pour l'enzyme TPH1 présentent des embryons avec des anomalies développementales soulignant le rôle important de la 5-HT dans le développement embryonnaire de ce rongeur (Côté et al., 2007; Dubé et Amireault, 2007).

1.4 Les objectifs de l'étude

L'objectif général du laboratoire est d'isoler et de caractériser le récepteur à 5-HT impliqué dans la reprise de la méiose des ovocytes de *Spisula solidissima*, de même que d'autres récepteurs aminergiques potentiellement impliqués dans la reproduction. Divers clones partiels d'ADNc, codant pour des récepteurs aminergiques et préparés à partir d'ARNm d'ovocytes de la palourde, ont été isolés et la séquence complète de l'un d'eux a été obtenue.

Le but spécifique de ce projet est de caractériser ce récepteur aminergique, en identifiant son ligand naturel, ses voies de signalisation associées ainsi que ses autres propriétés pharmacologiques, tout en investiguant son rôle potentiel dans la reproduction. L'étude des rôles de récepteurs aminergiques dans la reproduction de la palourde, un modèle animal plus simple, pourrait guider l'analyse de fonctions similaires chez les organismes supérieurs, notamment chez les mammifères qui possèdent, entre autres, un réseau sérotoninergique dans leur système reproducteur.

2. ARTICLE

Characterization of a novel octopamine receptor expressed in the surf clam *Spisula solidissima*

* Cet article a été soumis en août 2009 à la revue « General and Comparative Endocrinology » et est actuellement en révision pour corrections mineures suite aux suggestions du comité de pairs de cette revue.

Véronique Blais, Nassim Bounif, and François Dubé*

CR-CHUM

(Centre de recherche du Centre Hospitalier de l'Université de Montréal)

Département d'obstétrique-gynécologie

Hôpital Saint-Luc, 264 René-Lévesque E.

Montréal, Québec, Canada H2X 1P1

2.1 Abstract

We have cloned and sequenced a cDNA from the surf clam (*Spisula solidissima*, a pelecypod mollusc) that encodes an octopamine receptor that we have named Spi-OAR. The sequence of Spi-OAR shares many similarities with two *Aplysia* and three *Drosophila* octopamine receptors belonging to a sub-group of β -adrenergic-like octopamine receptors. Using an expression vector and transient transfections of Spi-OAR into HEK 293 cells, we observed an increase of cAMP upon addition of octopamine and, to a lesser extent, of tyramine, but not after addition of dopamine, serotonin, or histamine. Using a battery of known agonists and antagonists for octopamine receptors, we observed a rather unique pharmacological profile for Spi-OAR through measurements of cAMP. Spi-OAR exhibited some constitutive activity in HEK 293 cells and no Ca^{2+} responses could be detected following addition of octopamine to Spi-OAR-transfected cells. RT-PCR analysis revealed ubiquitous expression of Spi-OAR mRNA in all adult tissues, oocytes and early embryos examined. While addition of serotonin to isolated clam oocytes resulted in meiotic activation, similar additions of octopamine had no effect, suggesting that its potential role in clam reproductive physiology differs significantly from that of serotonin. This work identifies Spi-OAR as a novel mollusc octopamine receptor closely related to other invertebrate β -adrenergic-like octopamine receptors, with possible reproductive and other physiological functions now amenable to further investigations and comparisons with more studied and familiar insect or gastropod mollusc octopamine receptors.

Keywords: Octopamine, G protein-coupled receptor, surf clam, *Spisula solidissima*, mollusc, oocyte, aminergic receptor, cAMP, calcium.

2.2 Introduction

Octopamine is a biogenic amine typically restricted to invertebrates that acts as a neurohormone or neurotransmitter with various roles similar to those of its vertebrate counterparts, epinephrine and norepinephrine. Octopamine, mostly studied in insects but also, to a lesser extent, in gastropod molluscs was shown to be involved in diverse functions ranging from locomotor activity to behavioral responses (reviewed in Roeder, 1999; Roeder, 2005). In *Drosophila*, for example, octopamine is involved in aggressive behaviors (Hoyer et al., 2008; Zhou et al., 2008), sleep (Crocker and Sehgal, 2008) and reproductive processes such as ovulation and egg-laying (Lee et al., 2009; Lee et al., 2003; Monastirioti, 2003; Monastirioti et al., 1996).

Octopamine exerts its numerous effects through activation of specific receptors, many of which have been molecularly characterized not only from *Drosophila* but also from several other insect species (reviewed in Evans et Maqueira, 2005). Some molluscan octopamine receptors have also been characterized from the gastropods *Lymnaea* (Gerhardt et al., 1997a; Gerhardt et al., 1997b) and *Aplysia* (Chang et al., 2000). These studies show that invertebrate octopamine receptors exhibit usual features of the vast family of G protein-coupled receptors (GPCRs) of the rhodopsin receptor type and seem to fall in at least three distinct classes that exhibit differential characteristics pertaining to their sequence or signalling properties, thereby reflecting their similarities with vertebrate adrenergic receptors (Evans and Maqueira, 2005; Roeder, 2005).

Octopamine is involved in insect reproduction as evidenced by the sterility of octopamine-less female *Drosophila* mutants that lack the enzyme tyramine β -hydroxylase (T β H) required for octopamine production from its precursor tyramine

(Monastirioti, 2003; Monastirioti *et al.*, 1996). The egg-laying behavior is inhibited in the absence of octopamine, ovulation is impaired and mature eggs are retained in the ovaries (Monastirioti, 2003). This might be related to previously demonstrated dual effects of octopamine, in the locust, in inducing relaxations of oviductal (Nykamp and Lange, 2000; Orchard and Lange, 1985; Orchard and Lange, 1986) and contractions of spermathecal muscles (Clark and Lange, 2003; Lange and da Silva, 2007), both processes favoring release of male and female gametes in the genital chamber for fertilization. Interestingly, *Drosophila* mutants lacking the so-called “octopamine receptor of mushroom bodies” (OAMB) exhibited a female sterility phenotype very similar to that of female mutants lacking T β H, in that they had impaired ovulation and an abnormal retention of mature eggs in their ovaries (Lee et al., 2003). OAMB, a receptor previously characterized and known to elicit Ca²⁺ and cAMP increases (Han et al., 1998), was shown to be expressed in the female reproductive system and in mature eggs where its absence was causal in the observed female sterility (Lee et al., 2003). Recent studies further showed that OAMB needs to be expressed only in oviductal epithelium cells, not in the brain, to rescue ovulation in OAMB-less female mutants and that ovulation is directly linked to Ca²⁺ increase, rather than cAMP, through the involvement of calmodulin-dependent protein kinase II in this process (Lee et al., 2009).

That octopamine is involved in reproduction of *Drosophila*, and presumably other insects, suggests a potentially similar role in molluscs, especially in pelecypods already known to be influenced by another biogenic amine, serotonin, in their reproductive physiology. Indeed, in the surf clam (*Spisula solidissima*, a marine pelecypod mollusc), but also in several other related species, serotonin is a natural trigger for spawning and may also regulate early meiotic activation of oocytes prior to their fertilization (Colas and Dubé, 1998; Hirai et al., 1988; Krantic et al., 1991; Krantic et al., 1993). As part of a search for amine receptors expressed in clam

gonads or oocytes, we isolated a full cDNA sequence encoding a novel surf clam octopamine receptor named Spi-OAR. We report the molecular and pharmacological characterization of this clam octopamine receptor and demonstrate that it represents a new member of the β -adrenergic-like class of octopamine receptors whose potential reproductive function, if any, differs from that of serotonin. Further studies on this new member of the octopaminergic receptor family should help elucidate the various roles of this amine in molluscan physiology.

2.3 Materials and methods

2.3.1 Animals and tissue preparations

Specimens of surf clams (*Spisula solidissima*) were collected during the summer months in Magdalen Islands (Quebec) by a local diver (Ghislain Cummings) and shipped by air within hours to CR-CHUM, Montreal. Animals were treated according to a protocol approved by our institutional animal care committee and under the Canadian Animal Care guidelines. Animals were transferred in a cooled (10°C) seawater aquarium and were kept for several weeks at this low temperature to maintain a reduced metabolism and keep the animals in a ripe stage for extended periods of time. When needed, animals were euthanized by rapid opening of valves and immediate dilacerations of tissues with scissors. When necessary, various clam tissues were collected and either used immediately or frozen in liquid nitrogen and kept at -80°C until needed for RNA extraction as described below.

2.3.2 *Handling of oocytes and embryos*

Female gonads were minced with scissors in Ca^{2+} -free artificial seawater (CaFSW) and filtered through cheesecloth to remove major tissue debris. Pure oocyte suspensions were then obtained by several washes by decantation with CaFSW and isolated oocytes (at the germinal vesicle stage, prophase I of meiotic maturation) were kept at 18°C until use. Sperm, allowed to ooze out from male gonads in Petri dishes, was collected “dry” with a Pasteur pipette and then stored undiluted in Eppendorf tubes at 4°C until used.

Artificial activation or fertilization of oocytes were performed in Ca^{2+} -containing artificial seawater prepared according to MBL formula (Costello and Henley, 1971) but with added HEPES (2 mM) rather than TRIS as a pH buffer (pH 8.0). For artificial meiotic activation experiments, oocyte suspensions (around 20,000 cells/ml) were divided in 1-ml aliquots in 24 well plates and serotonin, octopamine and/or KCl (0.53 M) were added at final desired concentrations. Germinal vesicle breakdown (GVBD) is the first visible sign of meiosis reinitiation and normally occurs within 12-15 min after artificial activation or normal fertilization, followed by polar body extrusions at 45-60 min after activation (Allen, 1953). Meiosis reinitiation was thus assessed by counting oocytes that had undergone GVBD after 30 min at room temperature. For doing so, oocytes were briefly fixed in 2% formaldehyde in a glucamine-acetate buffer (250 mM N-methyl glucamine, 250 mM potassium gluconate, 50 mM Hepes and 10mM EGTA pH 7.4 with glacial acetic acid). Percentages of GVBD were determined by counting 100-200 oocytes under the microscope in four separate experiments with two different females.

For culturing embryos, oocytes (5,000 cells/ml) were normally fertilized with a 20,000-fold dilution of “dry sperm” and allowed to develop with constant stirring of

the suspension maintained at 18°C in a temperature-controlled water bath. Samples of embryos (>80% at desired given stage) were collected at the two-cell and the four-cell stages as well as 24-hour old late trocophore larvae and immediately frozen and kept at -80°C until used for RNA extraction. Octopamine, serotonin and all other agonists, antagonists or inhibitors were purchased from Sigma Chemical Co., unless otherwise stated, and all other chemicals were reagent grade.

2.3.3 Isolation and purification of initial clones

As part of a search to identify surf clam serotonergic and other aminergic receptors potentially involved in reproduction and early oocyte and embryo development, cDNAs from isolated oocytes were used to screen for receptor sequences by polymerase-chain reaction using degenerate oligonucleotides for highly conserved domains of seven-transmembrane domain G-protein-coupled receptors. One such primer pair consisted of a forward degenerate oligonucleotide for transmembrane region 3 of several invertebrate serotonin receptors coupled with a reverse oligonucleotide corresponding to transmembrane region 7 of similar receptors (forward:ATITGGATI(T/A)(C/G)IG(T/C)IGATGTIITITG(T/C)(T/G)(G/A)IACIGC; reverse:(A/G)TTIAGIA(G/A)I(C/G)(T/A)GTT(G/A)(A/G)(A/C)(G/A)TAICCIA(G/A)CCA). Of several bands obtained through PCR amplification (at low annealing temperature, 50°C), one corresponding to Spi-OAR yielded an initial 583 bp clone spanning from TM-3 to TM-7. Using this partial sequence, oligonucleotides were designed for use in a RACE procedure (rapid amplification of cDNA ends, using a kit from Invitrogen) and also a “genome walking” strategy using genomic DNA (Genome Walker Universal kit, Clontech) for the construction of a pool of adaptor-ligated DNA fragments subjected to nested PCR with a mix of adaptor-specific primer and gene-specific primer. The complete intronless sequence of Spi-OAR could

thus be deduced with several overlapping genomic or cDNA clones and the final full sequence was confirmed with PCR amplification of oocyte cDNAs with Hi-fidelity Platinum Taq polymerase (Invitrogen) using two oligonucleotides spanning the whole sequence from the 5' to the 3' untranslated regions.

2.3.4 Sequence alignments and phylogenetic analysis

The amino acid sequences of 24 receptors were aligned and variable regions including extracellular N-terminal end, second extracellular loop, third intracellular loop and C-terminal end were removed for phylogram analysis of Spi-OAR with selected invertebrate octopamine/tyramine receptors, molluscan aminergic receptors and other mammalian related GPCRs. Alignment and genetic distance were determined with a Blossum scoring matrix option in ClustalW and the neighbor-joining method was used with ClustalW. A 1000-fold bootstrap re-sampling was selected and resulting trees were visualized by Treeview software. Human rhodopsin receptor was used as an outgroup.

2.3.5 Vector construction and transfection of HEK 293 cells

Based on the sequence of full length Spi-OAR cDNA, a new set of oligonucleotides were designed comprised of a forward primer (OCT03, Fig. 1, p.58) corresponding to the first 20 coding nucleotides with additional 5' nucleotides introducing a nine amino acid FLAG epitope and with an upstream HindIII restriction site; the reverse primer (OCT04, Fig. 1, p.58) corresponded to the 22 last nucleotides including the STOP codon followed by a NotI restriction site. The PCR product (1.6 kb band) obtained with these primers from amplification of oocyte cDNAs with

High-fidelity Taq polymerase was digested with restriction enzymes, recovered from an agarose gel and ligated in pCEP4 expression vector (Invitrogen) similarly digested, with DNA ligase. Ligation products were used to transform *E. coli* bacteria and positive colonies were selected, grown in suspension and further characterized by restriction analysis and sequencing. Vector constructs possessing the proper insert were prepared with Qiagen midiprep kit and used for transfection in HEK 293 cells.

HEK 293 cells (purchased from ATCC) were grown in DMEM medium containing glutamine and supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS, Invitrogen) and 100U/ml penicillin and streptomycin. Cells grown, in 5% CO₂ at 37°C, to ~ 80-90% confluence were used for transfection by pCEP4-Spi-OAR construct with FuGENE® 6 transfection reagent according to manufacturer's specifications (Roche Pharmaceuticals). Transient transfections were either performed with adherent cells or cells in suspension typically incubated in 96-well plates at 50,000 cells/well or other convenient concentrations depending on experiments. Cells were then incubated for ~ 48 hours after transfection before subjecting them to experimental conditions with additions of various biogenic amines, synthetic agonists or antagonists, with or without added forskolin (10 µM) and in presence of IBMX (0.2 mM) a potent cyclic nucleotide phosphodiesterase inhibitor. Initial experiments included parallel transfections with an empty pCEP4 vector as control.

2.3.6 cAMP measurements in transfected HEK 293 cells

HEK 293 cells, transfected with Spi-OAR construct as described above, were grown in 96-well plates at a concentration of 50,000 cells/well. Two days after transfection, the medium was replaced with fresh DMEM containing IBMX (0.2

mM) but no phenol red. After an equilibration time of 1 hour, cells were treated with octopamine or various agonists or antagonists, with or without added forskolin and in presence of IBMX (0.2 mM). When the agonist/antagonist vehicle was DMSO, control samples included cells treated with an equivalent amount of vehicle alone. After 15 min incubation at 37°C in presence of agonist or antagonist, the reaction was stopped by adding an equal volume of detergent (solution B of cAMP Biotrak kit, Amersham Biosciences). Samples were then frozen at -80°C for later measurements of cAMP with the above-mentioned enzyme immunoassay kit using the 450-nm non-acetylation colorimetric procedure described in the manufacturer's booklet. All experiments were performed at least two or three times, with duplicate samples each time, and yielded similar results from one experiment to the other. For easier comparison, cAMP levels are presented in most figures as fold increase values compared to the basal level of untreated control cells. Average minimal and maximal absolute values of cellular cAMP, as for untreated cells vs forskolin-treated cells, ranged from 2,500 to 20,000 fmoles cAMP/20,000 cells and varied only slightly from one experiment to another.

The effect of maintaining a low intracellular Ca^{2+} on cAMP levels was analyzed by incubating Spi-OAR-transfected cells in presence of the calcium chelator BAPTA/AM at 20 μM for 10 min prior to addition of octopamine at 1 or 10 μM . The effect of raising intracellular Ca^{2+} on cAMP levels was tested by addition of 10 μM ionomycin to HEK 293 cells. Cells treated with 10 μM forskolin, a direct adenylate cyclase activator, served as positive controls in all cAMP-measuring experiments.

2.3.7 Indirect immunofluorescence

The cDNA of Spi-OAR receptor introduced into the expression pCEP4 vector contained a short N-terminal-added epitope recognizable by the primary antibody

anti-FLAG™ M2 (Sigma) allowing the localization of Spi-OAR in transiently transfected HEK 293 host cells by indirect immunofluorescence with the use of a Cy3-conjugated secondary antibody.

Verification of proper expression of Spi-OAR in HEK 293 cells transfected with Spi-OAR construct was performed by indirect immunofluorescence microscopy using the N-terminal FLAG epitope as a marker of expression. Transfected HEK 293 cells grown on cover slips coated with polylysine were fixed for 10 min on ice in Dulbecco's phosphate buffered saline 1X (D-PBS) containing freshly prepared 4% paraformaldehyde. After several washes in D-PBS on ice, fixed cells were incubated 2 hours with primary anti-FLAG™ M2 antibody (Sigma Chem. Co.) at a final concentration of 10 µg/ml in D-PBS. Following four consecutive washes with D-PBS on ice, a second incubation for 1 hour at 4°C in the dark was carried out with Cy3-conjugated goat anti-rabbit antibody (Jackson Immunoresearch) 1/100 diluted in D-PBS containing 0.05 % dry milk. After three washes in D-PBS, semi-permanent slides were prepared by applying a small drop of Permount™ and sealing the cover slips with nail polish. Samples were examined with a Leitz Diaplan fluorescence microscope and photographs were taken with a Canon Powershot A630 digital camera using a Qioptiq microscope adapter (Qioptiq Imaging Solutions).

2.3.8 Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)

Total RNA was extracted from different tissues, oocytes or embryos using Trizol® reagent (Invitrogen) according to the manufacturer's specifications. Total RNA (5 µg) was used for reverse transcription with Superscript™ III enzyme (Invitrogen). Mock-reverse transcription was performed by omitting the enzyme and using the products as controls (-RT samples) in subsequent PCR runs. Single-

stranded cDNAs and PCR amplifications were performed in a final volume of 50 μ l containing 20 mM Tris-HCl (pH 8.4), 0.2 mM dNTPs, 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂ and 2 U of Taq DNA polymerase. Pairs of primers (sense primer 648F (nuc570-nuc595): 5'-GTACACAACGTCCGACACTCTCAAAG-3'; reverse primer 648R (nuc967-nuc990): 5'-AAAACACGCTGCTCCAATCATTTTC-3') were used at 0.2 μ M each and yielded an amplicon of 420 bp. When required, a second PCR run was performed as a nested PCR using additional primers (sense primer 648F2 (nuc758-nuc785): 5'-GCTACCATATAAAGGAACTTTCGCCCTC-3'; reverse primer 648R2 (nuc848-nuc868): 5'-TTTTCGCTGCCTTGTGCTCTC-3') within the region of first amplicon to produce an amplicon of 110 bp. The PCR program (35-38 cycles) consisted of a denaturation step at 94°C for 45 seconds, primer annealing at 55°C for 90 seconds and an extension phase at 72°C for 90 seconds with a final incubation period at 72°C for 20 minutes. Primers for β -actin (sense primer: 5'-ATCATGTTTGAGACCTTCAA-3'; reverse primer: 5'-CATCTCTTGCTCGAAGTCCA-3'), used in parallel as positive controls, yielded a 318 bp amplicon (Feinmesser et al., 1992). Each reaction was loaded on a 2% agarose gel stained with ethidium bromide and was performed at least three times with similar results.

2.3.9 Intracellular Ca²⁺ measurement in Spi-OAR transfected cells

After transfection with Spi-OAR, HEK 293 cells were seeded at 200,000 cells/well in 6-well plates containing cover slips previously coated for 20 min with polylysine, and allowed to grow for 48 hours. Cells were then incubated for 20-25 min at 37°C in presence of 5 μ M Fura2-AM and 0.02% Pluronic F127 (Invitrogen). Following two washes with HEPES buffer (NaCl 150 mM, KCl 5mM, HEPES 5 mM, Glucose 11 mM, MgCl₂ 1 mM, CaCl₂ 2 mM, pH 7.4), cover slips were transferred in

a perfusion chamber on an inverted fluorescence microscope stage (Nikon Diaphot, Tokyo, Japan). Cells were perfused at a constant flow rate of 3ml/min and were challenged with octopamine at 1 or 10 μ M, and then with ionomycin (10 μ M) or ATP (200 μ M) as controls to confirm the capacity of cells to raise their internal Ca^{2+} and the efficiency of our set-up to detect it.

Fluorescence signals were obtained from a fluorescence lamp coupled to a high speed filter changer (Lambda DG-4, Sutter Instrument Company) and a refrigerated CCD Camera (Photometrics Cool SNAP HQ, Roper Scientific). Excitation wavelengths (340 and 380 nm) were delivered at 2 sec intervals, and fluorescence emission was measured at 510 nm. The collected data were then analysed by MetaFluor® program 6.1 (Universal Imaging Corporation) and expressed as 340/380 fluorescence ratios directly proportional to Ca^{2+} concentration. Typical 340/380 recordings were then redrawn with Sigma Plot 11.0 software.

2.3.10 Statistical analyses

All statistical analyses were performed using the SPSS software program. The results on cAMP measurements are expressed as means of cAMP fold increase relative to control \pm SEM or to control \pm SD and each experiment was performed two or three times in duplicate. Means were analyzed using one way analysis of variance (ANOVA, $P < 0.01$) with a Dunnett's procedure that allows comparison of each outcome versus control. However, means for the experiment altering cellular calcium (Fig. 6, p.68) were analysed by unpaired Student's t tests ($P < 0.01$). Statistically significant differences between the means are indicated with an asterisk (*) and ns indicates no significant difference.

2.4 Results

2.4.1 *Cloning and sequence analysis of Spi-OAR cDNA*

Using degenerate oligonucleotide primers for highly conserved GPCR transmembrane regions (TM-III and TM-VII), we initially obtained a partial fragment of 583 bp (nuc408-nuc990) by RT-PCR using clam oocyte cDNAs. After sequencing this fragment, a procedure of rapid amplification of cDNA ends (RACE procedures) was undertaken with specific primers to clone 3' and 5' ends of putative Spi-OAR sequence. A final full length cDNA of 1416 nucleotides comprising an open reading frame of 1206 bp was obtained by sequential anchored PCRs. This intronless nucleotide sequence, called Spi-OAR, encodes a deduced protein of 388 amino acids with a predicted molecular mass of 44 kDa (Fig. 1, p.58). An analysis of hydrophobicity of Spi-OAR with the HMMTOP transmembrane topology prediction server (Tusnady and Simon, 2001) reveals the presence of seven hydrophobic transmembrane domains (TM) connected by intra and extra-cellular loops including an extracellular N-terminus and a cytoplasmic C-terminus characteristic of GPCR. Several highly conserved motifs and amino acids among the GPCR superfamily are found in Spi-OAR, including the D134RY motif located at the end of the TM-III thought to be implicated in agonist binding, receptor structure and activation process (Fraser et al., 1988). Other conserved motifs are also present in Spi-OAR sequence: the motif L79-X-X-X-D located in TM-II region, the motif N327-P-X-X-Y in TM-VII (Oliveira et al., 1999) involved in ligand-induced internalization and conserved in adrenergic receptors (Kurten, 2003), and the motif P291-F-F in TM-VI, with the second F characteristic of catecholamine, serotonin and histamine receptors. In addition, the motif V118-L in TM-III and S206-S-S in TM-V are typical for catecholamine receptors. Additional amino acids conserved in GPCR are also present (G53, N54) as well as two conserved cysteines (C110, C194), respectively in first and

second extracellular loops, and thought to make a disulfide bond (Spence et al., 1998). Finally, the primary sequence of Spi-OAR indicates three potential sites for N-linked glycosylation (N14, N19 and N25) localized in the extracellular N-terminus and two consensus intracellular sites for phosphorylation by casein kinase II (S247 and S363), respectively in the third intracellular loop and C-terminal cytoplasmic end. No sites for phosphorylation by protein kinase C or protein kinase A were found.

An analysis of Spi-OAR full amino acid sequence by the BLAST server reveals a high degree of similarity with diverse biogenic amine GPCRs, but particularly with octopamine receptors and β -adrenergic receptors. Spi-OAR has the greatest identity with two molluscan octopamine receptors from *Aplysia californica* (Apoa1(Ac), 62%) and *A. kurodai* (Apoa1(Ak), 57%), and to a lesser extent with an insect octopamine receptor from *Drosophila* (DmOct β 3, 51%). This suggests that Spi-OAR is likely to belong to the so-called “ β -adrenergic-like” octopamine receptors that share some characteristic features of human β -adrenergic receptor (41%) including a rather short third intracellular loop in addition to common signalling properties. For comparison, two other molluscan aminergic receptor sequences, namely *Aplysia* dopamine (Apdop1, 38%) and serotonin (Ap5-HTB1, 34%) receptors, have a noticeable but lower identity with Spi-OAR. An alignment of six of these selected sequences with Spi-OAR is presented (Fig. 2, p.60). As expected, the amino acid conservation was greatest within the seven putative transmembrane domains and among most conserved motifs noted above (Fig. 2, p.60).

A phylogram analysis with different invertebrate octopamine/tyramine receptors, molluscan aminergic receptors and other mammalian adrenergic receptors (Fig. 3, p.62) confirms that Spi-OAR is likely a new member of “ β -adrenergic-like” octopamine receptors among which are found the two above-mentioned *Aplysia* receptors as well as three related *Drosophila* octopamine receptors respectively

named $\beta 1$ to $\beta 3$. Two other octopamine receptor sub-groups can be better associated with mammalian α -1 and α -2 adrenergic receptors, the latter one comprising some characterized tyramine receptors (Fig. 3, p.62). Interestingly, it can be observed that Spi-OAR is very close to some insect octopamine receptors of the same β -adrenergic-like subgroup, while it is more distant from other molluscan aminergic receptors such as *Aplysia* or *Lymnaea* serotonin receptors. However, Spi-OAR shares more similarities with some of these latter aminergic receptors than to other octopamine or tyramine receptors not belonging to the “ β -adrenergic-like” subgroup. Interestingly, octopamine or tyramine receptors of each of the three sub-groups share not only amino acid similarities but also some common signalling properties in that they promote similar Ca^{2+} or cAMP responses upon activation.

2.4.2 Expression in HEK 293 cells and receptor signalling assay

The entire Spi-OAR coding sequence was introduced in pCEP4 with an added N-terminal FLAG epitope. HEK 293 cells were transiently transfected with the pCEP4-Spi-OAR construct and we used an indirect immunofluorescence procedure with nonpermeabilized cells to assess proper expression of Spi-OAR. Figure 4 (p.64) shows a typical efficient detection of extracellular fluorescence with the anti-FLAG antibody in HEK cells transfected with Spi-OAR (Fig. 4B, B', p.64) but not with the empty pCEP4 vector (Fig. 4 A, A', p.64). This confirms the proper expression and localization of Spi-OAR in transfected HEK 293 cells that exhibited positive fluorescence signals reproducibly in 15-30% of transfected cells.

We then applied octopamine, tyramine and other biogenic amines to transfected HEK 293 cells and measured their cAMP levels following treatment. Figure 5 shows that a statistically significant rise of cAMP was observed after adding

1 μ M octopamine (expressed as fold increase relative to untreated control, mean \pm SEM, 3.68 ± 0.34) and also, to a lesser extent, after adding tyramine (mean \pm SEM, 2.50 ± 0.30). Similar additions of 1 μ M histamine, dopamine or serotonin did not cause any change in cAMP (Fig. 5, p.66). Forskolin, a direct activator of adenylate cyclase used as a control, induced a large increase in cAMP level (mean \pm SEM, 10.21 ± 0.59) (Fig. 5A, p.66). No change in cAMP level was detected for cells transfected with the empty vector only, except for the forskolin control (Fig. 5B, p.66). These experiments suggest that octopamine is the natural ligand of Spi-OAR and that it causes an elevation of cAMP when activated. Moreover, Spi-OAR expression was performed in other heterologous systems for multiple comparisons (pCEP4 and pcDNA3.1 expression vectors, HEK 293 and CHO cells). In all cases, transient transfections with the Spi-OAR sequence induced a significant cAMP rise after stimulation with octopamine (data not shown).

We then verified whether any Ca^{2+} response could be induced upon binding of octopamine to Spi-OAR. To do so, Spi-OAR-transfected cells were loaded with the Ca^{2+} -sensitive fluorescent probe Fura-2 and their internal Ca^{2+} was monitored with a fluorescence microscope coupled to a setup allowing measurements of 340/380 Ca^{2+} -dependent fluorescence ratios. Figure 6A (p.68) shows a typical recording of Ca^{2+} levels in Spi-OAR-transfected cells after perfusion of 10 μ M octopamine which induced no detectable elevation of Ca^{2+} . However, perfusion of 10 μ M ionomycin, a Ca^{2+} ionophore used as positive control, induced a rapid significant increase of Ca^{2+} over the basal level (Fig. 6A, p.68). Similar recordings were performed with more than 100 transfected cells with similar results showing that Ca^{2+} levels remained unchanged upon activation of Spi-OAR by octopamine. We next evaluated whether “clamping” intracellular Ca^{2+} by incubating Spi-OAR-transfected HEK cells in the presence of BAPTA, a calcium chelating agent, or raising their intracellular Ca^{2+} with the Ca^{2+} ionophore ionomycin would alter their cAMP levels and reveal any possible

crosstalk between Ca^{2+} and cAMP levels. Figure 6B (p.68) shows that altering Ca^{2+} with either BAPTA or ionomycin has no effect on cAMP levels of Spi-OAR-transfected cells, suggesting that Ca^{2+} is neither directly nor indirectly linked to observed changes in cAMP levels. Therefore, the cAMP increase induced by octopamine appears completely independent of Ca^{2+} and activation of Spi-OAR does not involve any crosstalk between these two signalling pathways (Fig. 6B, p.68).

2.4.3 Constitutive receptor activity

Interestingly, the comparison of cAMP levels between cells transfected with pCEP4-Spi-OAR construct compared to the empty pCEP4 vector consistently indicated a higher cAMP level in Spi-OAR-containing cells without any ligand added, suggesting a possible constitutive activity of the expressed receptor. This was confirmed in an experiment in which HEK cells were transfected with various quantities of the pCEP4-Spi-OAR construct or the empty vector that showed a dose-response effect between the amount of added Spi-OAR and the level of cAMP, in presence or absence of octopamine (Fig. 7, p.70). cAMP levels increase with the amount of added Spi-OAR construct in the lower range of vector concentrations with presumably increased levels of Spi-OAR expression, while cAMP levels off and eventually falls with higher vector concentrations known to reduce the transfection efficiency (Fig. 7, p.70). This confirms the slight constitutive activity of Spi-OAR when expressed in HEK 293 cells consistently seen in other experiments that were all performed at the optimal vector concentration.

2.4.4 *Pharmacological analysis of Spi-OAR*

To complete the pharmacological profile of Spi-OAR, cAMP levels in HEK 293 cells expressing Spi-OAR were measured following stimulation with different known agonists and antagonists of octopamine (Fig. 8, p.72). Using a previously reported protocol (Maqueira et al., 2005), cells were stimulated with forskolin prior to adding a battery of selected agonists to transfected cells and measuring their cAMP levels (Fig. 8A, p.72). The rank order of potency of various octopamine agonists was: octopamine = tyramine = clonidine = tolazoline > naphazoline = isoproterenol = adrenaline, the latter three having no significant stimulatory effect on cAMP levels (Fig. 8A, p.72). Various octopamine antagonists, added after a prior stimulation by octopamine and forskolin, were tested but no significant reduction in cAMP levels were observed (Fig. 8B, p.72).

2.4.5 *Expression of endogenous Spi-OAR*

An RT-PCR analysis was performed with specific oligonucleotides (named F and R, see Fig. 1, p.58) designed to reveal an expected 420 bp band (Fig. 9, p.74). Since Spi-OAR is an intronless DNA sequence, not only RNA samples were DNase-treated but control preparations lacking reverse transcriptase at the cDNA synthesis step were added to make sure that no contaminating genomic DNA could account for detectable PCR-amplified positive bands (samples RT-, Fig. 9A,B,C, p.74). Figure 9A shows that the expected amplified 420 bp band was detected with samples from all clam tissues including gills, female gonads, ganglia, heart and foot suggesting that this receptor is likely ubiquitously expressed in most tissues. Surprisingly, even though the first Spi-OAR DNA fragment originated from clam oocyte cDNAs, a nested RT-PCR strategy (including an additional round of PCR with oligonucleotides

F2 and R2, Fig. 1, p.58) was required for the clear detection of an expected amplicon of 110 bp from oocyte samples (Fig. 9B, p.74). In contrast, a single PCR round was sufficient to reveal an amplified band with RNA samples from embryos at different stages (2 cells, 4 cells, 24 hours, Fig. 9C, p.74). This suggests that while Spi-OAR mRNA might be present at low levels in unfertilized oocyte, its expression is apparently enhanced shortly after fertilization or, more likely, its mRNA is made more readily accessible for reverse transcription as a result of the early and major translational changes taking place at these stages and affecting mRNA conformation.

2.4.6 Effect of octopamine on oocyte meiotic reinitiation

Since Spi-OAR mRNA was detected in isolated clam oocytes (Fig. 9, p.74), this raised the possibility that the receptor itself is expressed in oocytes and might co-exist with a putative serotonin receptor already known to trigger meiotic reinitiation when activated. This prompted us to test the effect of octopamine on meiotic reinitiation (as evidenced by germinal vesicle breakdown, GVBD, that occurs within 15 minutes of meiotic activation), either alone or when added with various concentrations of serotonin or an artificially-activating treatment (high K^+ ions) (Fig. 10, p.76). Several distinct experiments revealed that octopamine alone, in the micromolar range, had no meiotic activating-effect on isolated oocytes (not shown) in strong contrast with the efficacy of serotonin in inducing GVBD. Figure 10 (p.76) further shows that octopamine, when added in combination with various concentrations (below or above threshold for activation) of serotonin or K^+ ions, also has neither any enhancing nor inhibiting effect on GVBD. This indicates that the potential function of octopamine in clam reproduction differs from that of serotonin and does not include the early stage of oocyte meiotic activation.

Figure 1. Nucleotide and deduced amino acid sequence of *Spisula* octopamine receptor (Spi-OAR) cDNA. The seven putative transmembrane domains are overlined and numbered consecutively (I-VII). Primer pairs used for the construction by PCR of the insert in expression vectors are indicated by horizontal arrows (OCT03 and OCT04), as well as those used for single PCR expression studies (Primers F-R, amplicon of 420 bp), and those used for nested PCR (Primers F2-R2, amplicon 110 bp). Potential sites for N-glycosylation (●) and consensus sites for phosphorylation by casein kinase (▲) are indicated. Restriction sites for NheI (nuc273 and 322) and NdeI (nuc642) are shown by arrows. No sites for phosphorylation by protein kinase C or protein kinase A were found. This sequence was deposited in GenBank under nucleotide accession number AY055377.


```

1  GTCTTGGTTGAACCTTCTTAAAGCGGAGTGATATAAGGT
1  M Y M E D S E L K S M I N N L T G L N E S V V G N
40  ATG TAC ATG GAG GAC AGC GAG TTA AAA TCA ATG ATA AAC AAT TTG ACT GGA CTA AAT GAA AGT GTT GTT GGC AAT
-----▶ OCT03

26  E T T P K V E Y L L I A I K S T A M L L I M L G A
115 GAA ACG ACA CCA AAG GTG GAG TAC TTA TTA ATT GCA ATT AAA TCA ACT GCA ATG CTA CTT ATT ATG CTT GGA GCA

TM I
51  I F G N I L V V T A V M K F E R L R S A I T N Y F
190 ATA TTC GGT AAT ATT CTA GTA GTT ACG GCG GTG ATG AAA TTT GAA CGA TTG CGG AGC GCA ATA ACT AAC TAC TTC

TM II
76  I V S L A F A D F L V S I L V M P F N A S I A I S
265 ATA GTC TCG CTA GCT TTC GCA GAT TTT CTC GTA TCA ATT CTA GTA ATG CCA TTT AAT GCT AGC ATC GCA ATC TCC
NheI ↑ NheI ↑

TM III
101 G K W M F G R T M G D V F N S N D V L F S T A S I
340 GGG AAA TGG ATG TTT GGC AGA ACG ATG TGT GAC GTG TTT AAT TCC AAC GAC GTA TTG TTC AGT ACG GCT TCT ATT

126 L H L C C I S M D R Y I A I I H P F K Y Q S K M T
415 TTA CAT CTT TGC TGT ATT AGT ATG GAC CGA TAT ATT GCA ATC ATA CAT CCG TTT AAA TAT CAG TCA AAA ATG ACA

TM IV
151 H F R V Y V M I A I T W I S S I L I S Y I P I Q S
490 CAT TTC CGC GTC TAT GTG ATG ATT GCT ATA ACT TGG ATC TCT TCA ATA CTT ATA TCA TAC ATA CCC ATA CAA TCA

176 H W Y T T S D T L K V M A E R P D D G L F I V N K
565 CAC TGG TAC ACA ACG TCC GAC ACT CTC AAA GTA ATG GCC GAA CGA CCT GAT GAT TGT CTG TTT ATA GTT AAT AAA
F -----▶

TM V
201 A Y A V V S S S I S F W I P C T I M V F V Y L K I
640 GCA TAT GCT GTC GTT TCG TCG AGT ATA TCC TTT TGG ATA CCT TGT ACC ATT ATG GTC TTT GTC TAT TTG AAG ATT
NdeI ↑

226 Y M E A R R Q E K Q I K Q S G Y H I K E L S P S E
715 YAT ATG GAA GCG AGG CGC CAA GAA AAA CAA ATT AAG CAA TCA GGC TAC CAT ATA AAG GAA CTT TCG CCC TCC GAG
F2 -----▶

251 Q T N L T D D Q S E N R N E R K R M R R E H K A A
790 CAG ACG AAC TTA ACT GAC GAC CAA AGC GAG AAT CGA AAC GAA CGC AAG CGC ATG CGC AGA GAG CAC AAG GCA GCG
◀-----

TM VI
276 K T L G I I M G A F V F C F L P F F T W Y L V T T
865 AAA ACT CTC GGA ATT ATT ATG GGA GCT TTT GTG TTC TGT TTT CTT CCT TTC TTT ACG TGG TAT CTT GTC ACA ACA
◀--- R2

301 L C G D A C P Y P E M V G A A C F W L G Y F N S C
940 TTG TGT GGA GAC GCT TGT CCT TAC CCA GAA ATG GTT GGA GCA GCG TGT TTT TGG CTG GGT TAC TTC AAC TCT TGT
◀----- R

326 L N P I I Y A Y F N R D F R G A F R K L L R L N K
1015 CTC AAC CCA ATT ATT TAT GCT TAC TTC AAT AGA GAT TTC CGA GGC GCC TTC AGA AAA CTG TTA AGA CTG AAT AAA

351 T F G G G G D G Y S D H S G F E N R E H C V Q V H
1090 ACG TTC GGT GGT GGT GGT GAT GGT TAC AGC GAC CAC TCT GGC TTT GAG AAC CGG GAA CAT TGT GTG CAA GTA CAT

376 S K H P C R N G N K S N V *
1165 TCT AAA CAC CCT TGT AGG AAC GGC AAT AAA AGT AAC GTA TGA 1206 TAATCTAACATACACTATCCGGGCGACGGA
◀----- OCT04

1237 CACTTTCTTCGCTTAAATAACAATGTACGGTTCAGGTCAACTGATCTACCATGAGTTTATCAATATCAATACATACCCAAATGTGTTTAAATTATTTCT
1337 AAAGAACAACCTTCGTTTCTGCTACAGCTAATTCAGAAAATGATTTTAATTTACTTGAAATATGGATTGAGCCACTTT 1416

```

Figure 2. Comparisons of Spi-OAR with other selected GPCRs. The amino acid sequence of Spi-OAR (AAL23575) was aligned with six other aminergic receptors using the ClustalW algorithm, including octopamine receptors from *Aplysia californica* (Apoa1(Ac), AAF37686), *Aplysia kurodai* (Apoa1(Ak), AAF28802) and *Drosophila melanogaster* (DmOct β 3, CAI56424), a serotonin and a dopamine receptor from *Aplysia californica* (respectively Ap5-HTB1, Q16950 and Apdop1, AAY00139), and the human β -2 adrenergic receptor (Hum β -2, AAF20199). Variable regions including extracellular N-terminal end, 2nd extracellular loop, 3rd intracellular loop and C-terminal end were removed and numbers in parentheses correspond to amino acids that are not shown in this figure. The seven putative transmembrane regions are overlined and numbered (I-VII). Asterisks (*) and black highlighted regions represent identical amino acids among all proteins and grey highlighted regions, in at least five of the seven sequences.

N-terminal		TM I	TM II	TM III	
Spi-OAR	(0-36)	AIKSTAMLLIMLGAIFGNILVVTAVMKFERLSAITNYFIVSLAFADFLVSILVMPFNASIAISG-KWMFGRTMCDVFNNDVLFSTA			
Apoa1 (Ac)	(0-38)	VL RGMAMAAIMVGAIFGNVLVISSVLRFGRLR-AITNFFIVSLAFADLLVAILVMPFSASMEISG-KWVFGRTMCDIFNANDVLFSTA			
Apoa1 (Ak)	(0-38)	VL RGMAMAAIMVGAIFGNVLVISSVLRFRERLR-AITNFFIVSLAFADLLVAILVMPFSASMEISG-KWVFGRTMCDIFNANDVLFSTA			
Ap5-HTB1	(0-36)	VLI GIVGSLIITVAVVGNVLVCLAIFTEPI LSHSKSNFFIVSLAVADLLALLVMTFALVNDMYG-YWLFGETFCFIWMSADVMCETA			
Apdop1	(0-54)	VLKGMFFSFCILLAISGNLLVCTAVFTERRLRKRVKNNYFIVSLAVADLLVACAVMTFALTNDVFH-EWLFGPVFCHTWISFDIMCSTA			
DmOctβ3	(0-139)	LLKGFIFSSIILAAVLGNALVLIISVQRNRKLR-VITNYFVVS LAMADMLVALCMTFNASVELSGGKWMFGPFMCNVYNSLDVYFSTA			
Humβ-2	(0-33)	VGMGIVMSLIVLAIVFGNVLVITAIKAFERLQ-TVITNYFITSLACADLVMGLAVVPFGAAHILMK-MWTFGNFWCEFWTSIDVLCVTA			
		** **	* * * * *	* ** *	
		TM IV	E2	TM V	
Spi-OAR		SILHLCCISMDRYIAIIHPFKYQSKMTHFRVYVMIATWISSILISYIPIQSH	(177-193)	CLFIVNKAYAVVSSSISFWIPCTIMVFVYLK	
Apoa1 (Ac)		SIIHLCCISMDRYIAILHPLQYESKMT RPRALLMLGVTVVASVLISYIPVYSQ	(178-194)	CPFIVNKVYAGVSSSVSEWIPCTIMIFVYIR	
Apoa1 (Ak)		SIIHLCCISMDRYIAILHPLQYESKMT RPRALLMLGVTVVASVLISYIPVYSQ	(178-194)	CPFIVNKVYAGVSSSVSEWIPCTIMIFVYIR	
Ap5-HTB1		SIFSICVTSYDRLKQVQKPLHYEEFMTTRALLIIACIMICSFVLSFVPIFLE	(177-224)	CLFDVHFTYSVIYSFICFYVPCTLMLTNYLR	
Apdop1		SILNLCVISFDRYIHIHKALYMDTMMTCKALVLIISVMILSALISILPVHLG	(195-229)	CIMELNFVYALVSSSISFYVPCLVMLVIYFK	
DmOctβ3		SILHLCCISVDRYYAIVRPLEYPLNMTHKTVCFMLANVMILPALISFTPIFLG	(280-296)	CSFVVNKAYALISSSVSEWIPGIVMLVMYWR	
Humβ-2		SIETLCVLAVDRYFAITSFPHYQSLLTKNKARVILMVIVSGLTSTFLPIQMH	(173-190)	CDFFTNQAVAIASSIVSEYVPLVIMVFVYSR	
		** * * *	* * *	* * *	
		I3	TM VI	TM VII	C-terminal
Spi-OAR	IYME	(229-272)	KAAKTLGIIMGA FVFCFLPFFITWYLVTTLCGDACPYPEMVGAACFWLGYENSCLNPPIIYAYFNRRDFR		(340-388)
Apoa1 (Ac)	IFLE	(230-273)	KAAKTLGIIMGA FIFLCLPFFSWYVATTMCRDSCPYPLLGSALFWVGYENSCLNPVIYAYFNREFR		(341-394)
Apoa1 (Ak)	IFLE	(230-273)	KAAKTLGIIMGA FIFLCLPFFSWYVATTMCRDSCPYPLLGSALFWVGYENSCLNPVIYAYFNRRDFR		(341-394)
Ap5-HTB1	LFLI	(260-294)	KAAARTLTIITGTFLACWLPFFIINPIAAADEH--LIPLECFMVTIWLGYENSSVNPPIYGTNSNKR		(360-453)
Apdop1	LFLF	(265-301)	KAAFTLGVITGVFLICWLPFFIINPIAAYDPT--LIPHKVFVVVTWLGYANSCCNPIIYSIFNAEYR		(367-450)
DmOctβ3	IFKE	(332-349)	--SARTLGIIMGVFELLWLPFFLWYVITSLCGPACPCPDVLVVVLFWVGYENSTLNPPIYAYFNRRDFR		(416-440)
Humβ-2	VFQE	(226-269)	KALKTLGIIMGTFTLWLPFFIVNIVHVIQDN--LIRKEVYILLNWLGYVNSGFNPPIYCRS-PDFR		(334-413)
		** * * *	* * * * *	* * * * *	*

Figure 3. Phylogram analysis of Spi-OAR with selected invertebrate octopamine/tyramine receptors, molluscan aminergic receptors and other mammalian related GPCRs. All numbers indicate the percentage bootstrap supporting each branch and the scale bar represents conversion of branch length to genetic distance between clades (0.1=10% genetic distance). This analysis includes octopamine receptors from *Drosophila melanogaster* (OAMB, AAC17442) (DmOctbeta3, CAI56424) (DmOctbeta1, CAI56428) (DmOctbeta2, CAI56430), *Periplaneta americana* (Pa oa1, AAP93817), *Apis mellifera* (AmOA1, Q70TB0), *Lymnaea stagnalis* (Lym oa1, AAC61296) (Lym oa2, O01670), *Heliothis virescens* (K50Hel, Q25188), *Aplysia californica* (Ap oa1, AAF37686), *Aplysia kurodai* (Ap oa1, AAF28802) and *Spisula solidissima* (Spi-OAR, AAL23575). Also, other aminergic receptors were analyzed including tyramine receptors from *D. melanogaster* (Tyr-dro, BAB71788), *A. mellifera* (AmTYR1, Q9NG02) and *Locusta migratoria* (Tyr-Loc, Q25321), serotonin receptors from *A. californica* (5-HTap2, AAM46088) (5-HTap1, AAC28786) (Ap5-HTB1, Q16950) and *L. stagnalis* (5HTlym, Q25414), dopamine receptor from *A. californica* (Apdop1, AAY00139) and human adrenergic receptors (Hum alpha-1A, NP_000671) (Hum alpha-2B, NP_000673) (Hum beta-2, AAF20199). This tree was rooted on human rhodopsin receptor (NP_000530) (branch not shown).

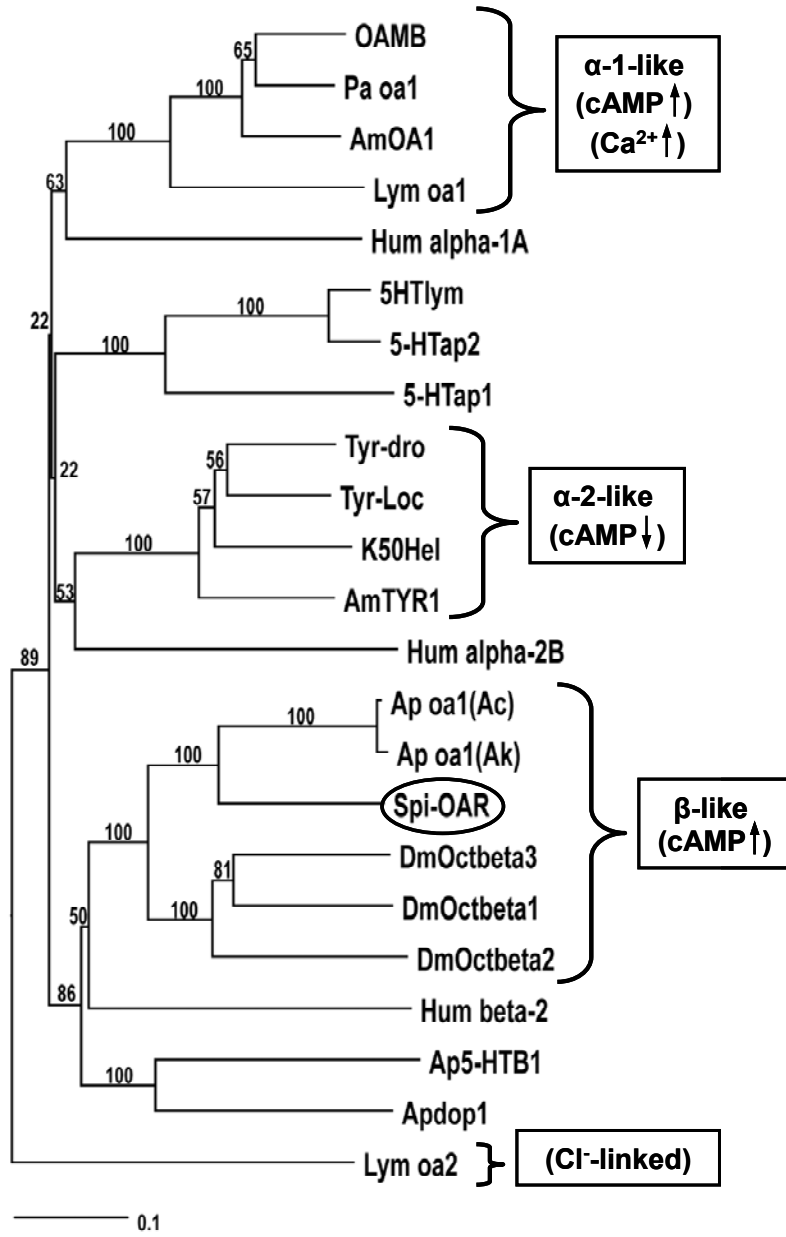


Figure 4. Immunofluorescence of HEK 293 cells expressing Spi-OAR. Phase contrast and corresponding fluorescence images of HEK 293 cells transiently transfected with the pCEP4-Spi-OAR construct containing the added N-terminal epitope (B-B') or transfected with an empty pCEP4 vector (A-A'). Expression of Spi-OAR at the membrane was shown by immunodetection of the N-terminal FLAG epitope in non permeabilized cells treated with an anti-FLAG monoclonal primary antibody followed by a Goat anti-Mouse secondary antibody coupled to Cy3. No fluorescence was detected in HEK 293 cells transfected with a control vector. Scale bars, 20 μm .

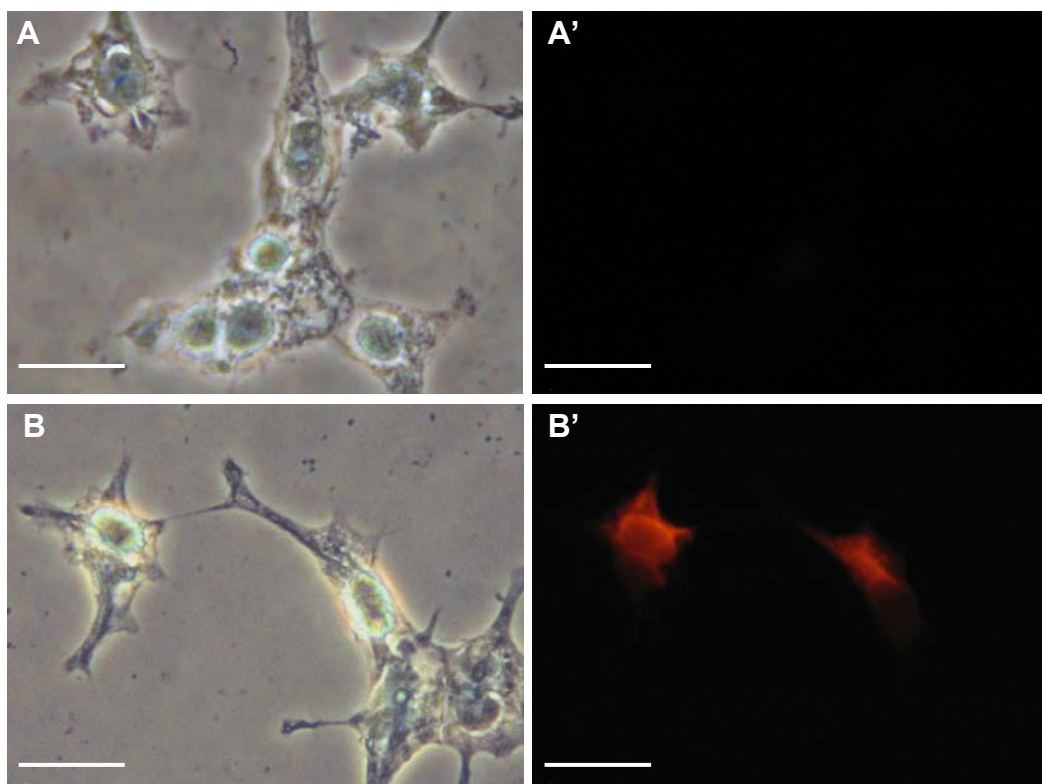


Figure 5. cAMP levels in HEK 293 cells expressing Spi-OAR and treated with various aminergic ligands. HEK 293 cells transfected with pCEP4-Spi-OAR construct (A) or empty pCEP4 vector (B) were treated with indicated biogenic amines (1 μ M) or with forskolin (10 μ M) as a control, and cAMP was measured after 15 min. Results are expressed as the fold increase of cAMP relative to untreated cells and represent means \pm SEM of three experiments in duplicate. Asterisks(*) indicate a significant difference ($p < 0.01$) compared to control cells.

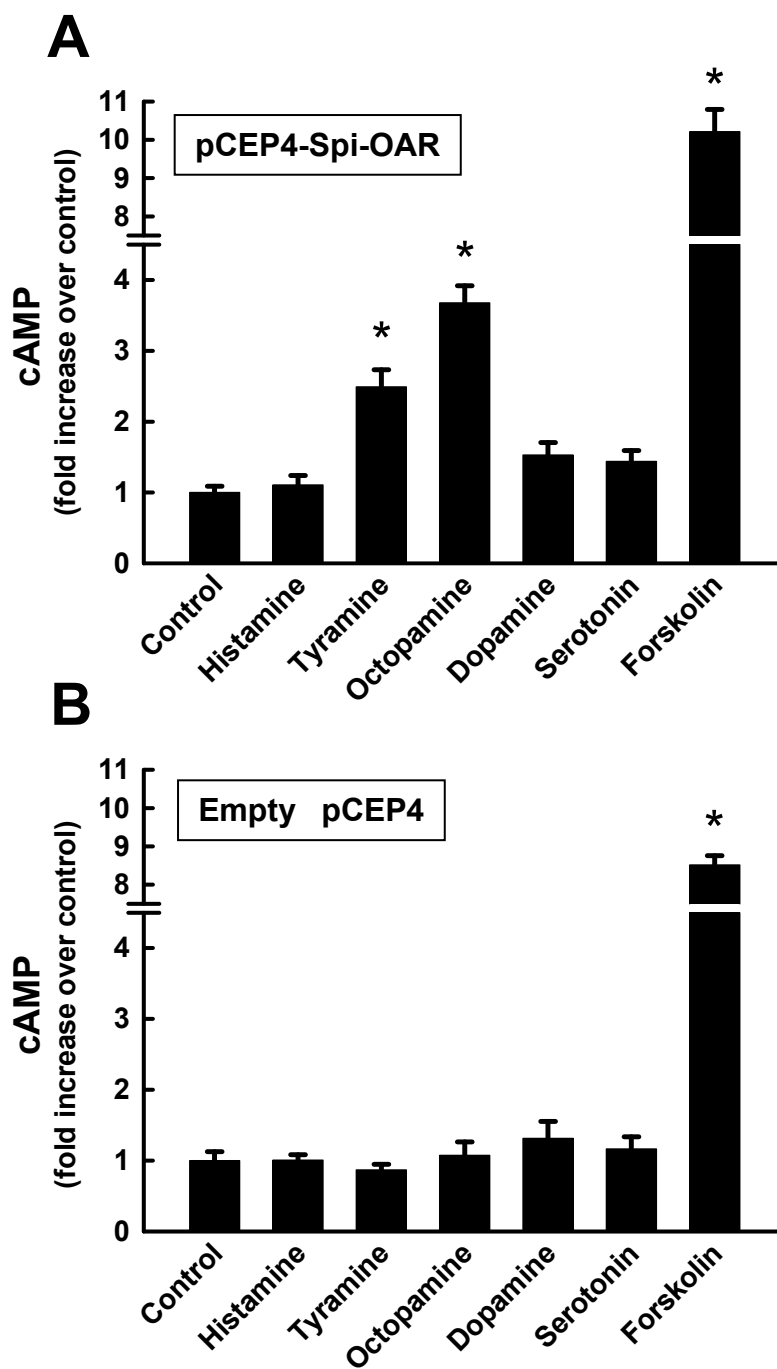


Figure 6. Absence of Ca^{2+} responses in Spi-OAR-transfected HEK 293 cells and effect of altering internal calcium on cAMP levels. (A) HEK 293 cells transfected with pCEP4-Spi-OAR were loaded with Fura2-AM and internal Ca^{2+} was monitored by recording fluorescence ratios at 340/380 excitation wavelengths as described in Materials and Methods. A typical recording of a cell perfused for 60 sec with medium containing octopamine (10 μM , first arrow) and later with medium containing ionomycin (10 μM , second arrow) as a control is shown. Similar results were obtained in recordings of over 100 Spi-OAR-transfected cells. (B) cAMP levels were measured in Spi-OAR-transfected cells treated with intracellular Ca^{2+} -chelating agent BAPTA-AM and treated or not with octopamine (1 or 10 μM) or cells treated with the Ca^{2+} ionophore ionomycin (10 μM). Neither of Ca^{2+} -altering treatments (down or up) affected cAMP levels as compared to controls. Mean results (\pm SEM) of three duplicate experiments are shown and ns represent a levels not significantly different by unpaired Student's t test ($P > 0.05$).

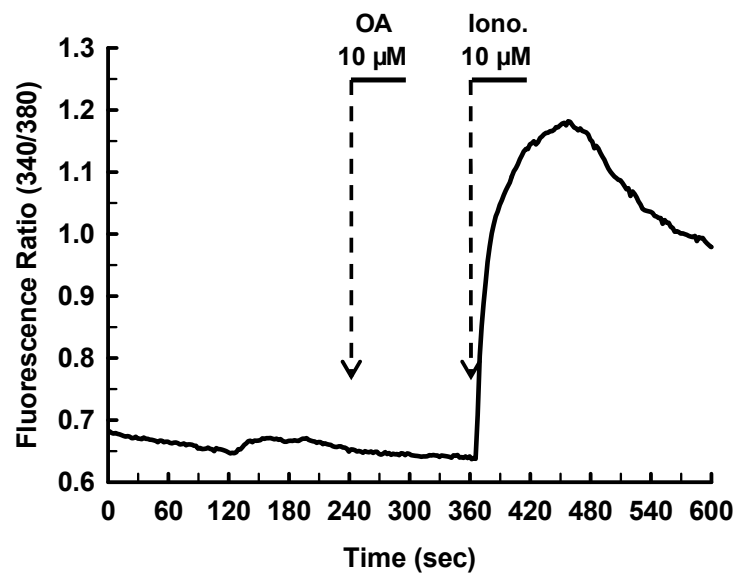
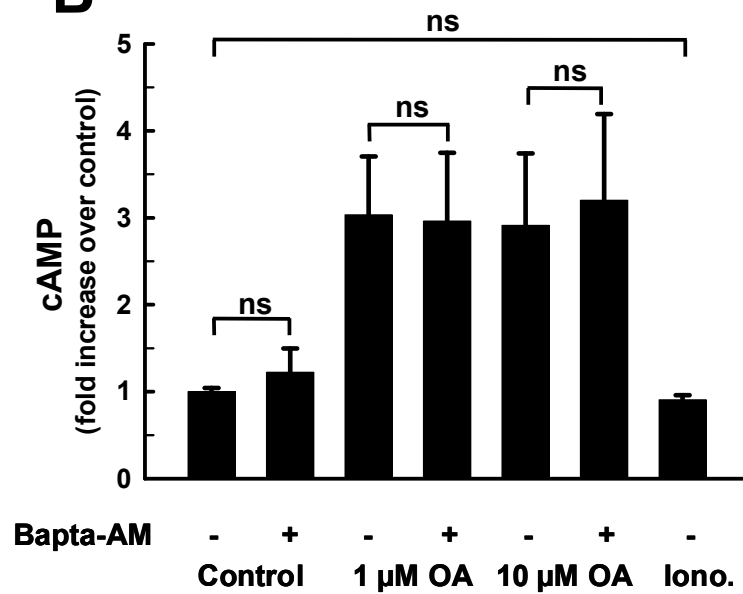
A**B**

Figure 7. Spi-OAR dose-dependent increase of cAMP levels and basal constitutive activity in HEK cells. HEK 293 cells were transfected with increasing indicated plasmid concentrations with pCEP4-Spi-OAR (triangles) or empty pCEP4 vector (circles). cAMP levels (in fmol/well) were then determined after a 15 min incubation in the presence (filled symbols) or absence (open symbols) of added octopamine (1 μ M). The average of two separate experiments conducted in duplicate is presented.

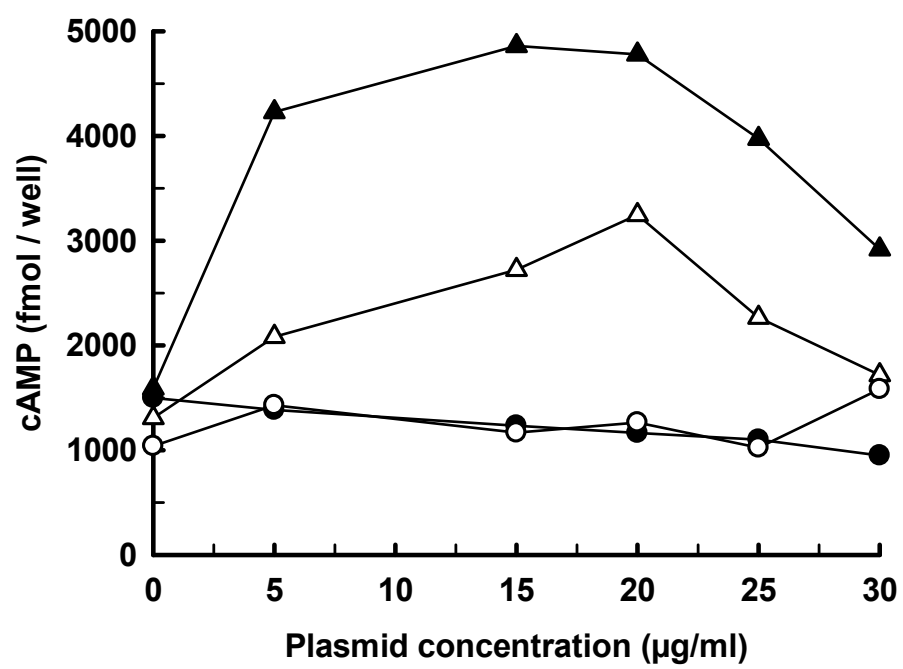


Figure 8. Effects of various agonists/antagonists on cAMP levels in HEK cells expressing Spi-OAR. (A) HEK 293 cells transfected with pCEP4-Spi-OAR were incubated with forskolin (10 μ M) plus indicated agonists at 1 μ M for 15 min and their cAMP levels were determined as in Figure 5. Mean results (\pm SD) of two duplicate experiments are shown. (B) Similarly transfected HEK 293 cells were incubated for 10 min in presence of indicated antagonists (10 μ M) prior to addition of forskolin (10 μ M) plus octopamine (10 μ M) and cAMP levels were determined after a further incubation of 15 min. Mean results (\pm SEM) of three duplicate experiments are shown. For both (A) and (B), Asterisks (*) indicate a significant difference ($p < 0.01$) in cAMP levels while “ns” means “not significant” compared to octopamine controls.

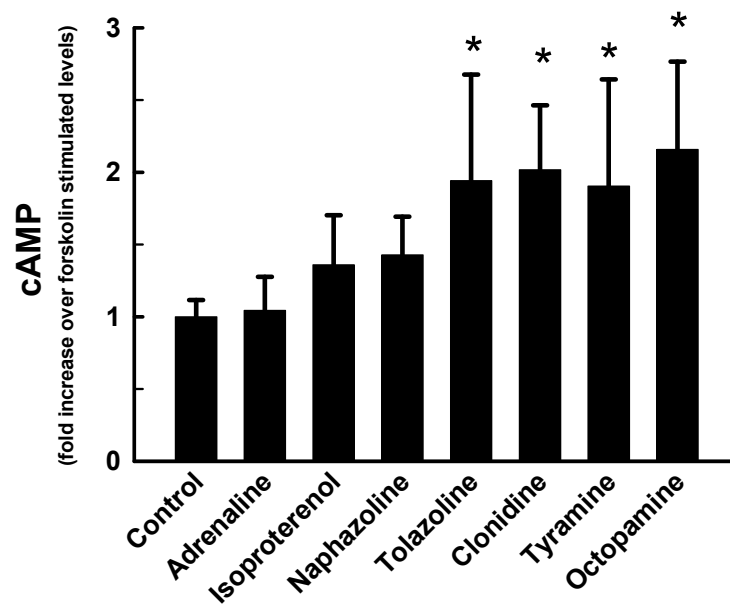
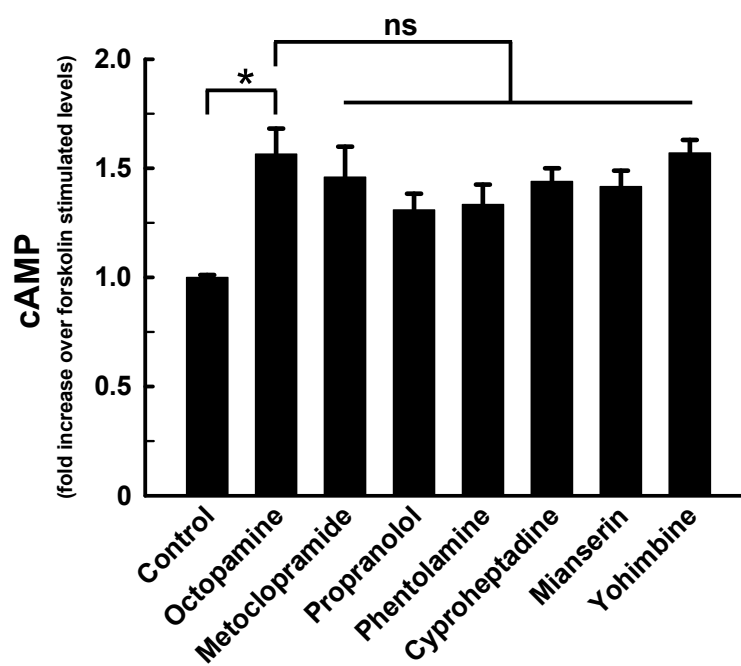
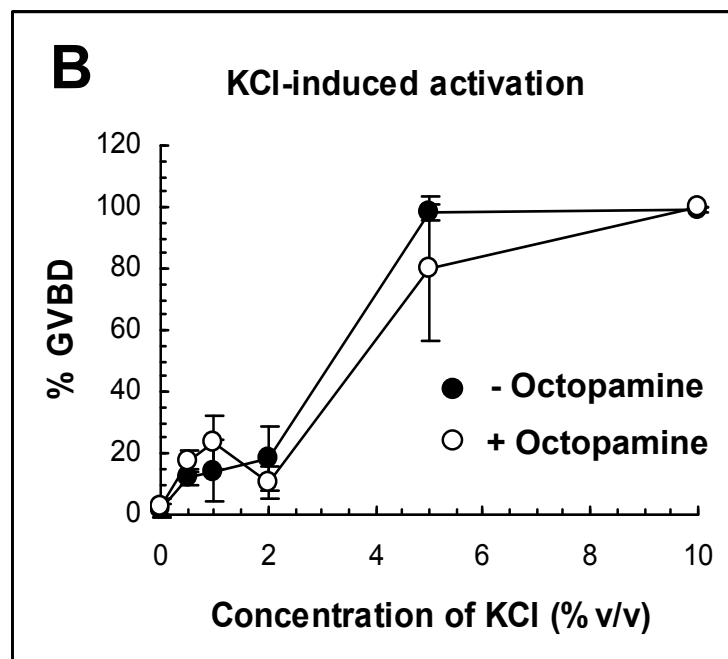
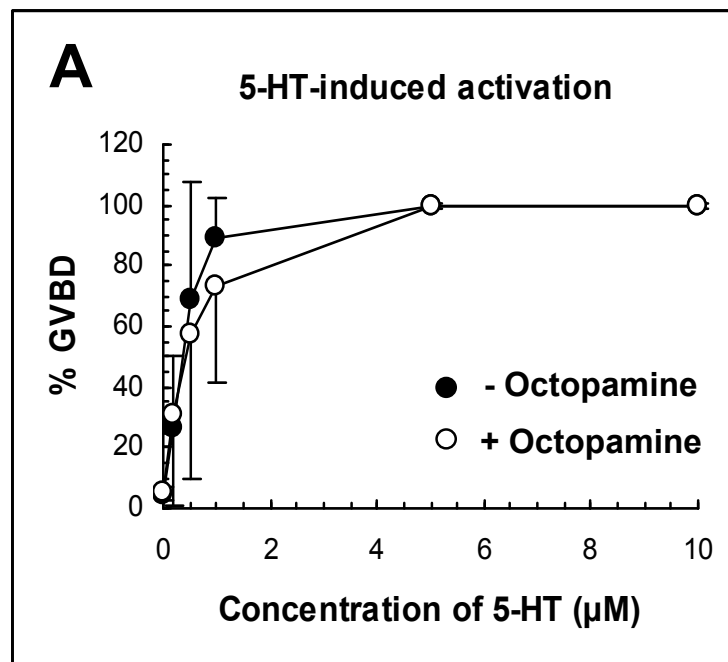
A**B**

Figure 9. RT-PCR analysis of Spi-OAR expression in various *Spisula* tissues.

Total RNA was extracted, reverse transcribed and cDNAs were used for PCR, as described in Materials and Methods, with oligonucleotide pairs specific for Spi-OAR or actin as a control. Negative controls were prepared exactly as experimental samples except that reverse transcriptase was omitted in the reverse transcription step (RT- samples). (A) Samples (1 to 6) are from isolated oocytes (1), gills (2), female gonad (3), ganglia (4), heart (5) and foot (6). Clearly visible amplicons were detected in all samples except isolated oocytes (1) with a faintly visible band; (B) Isolated oocytes yielded a detectable band when subjected to two rounds of amplification in a nested PCR strategy; (C) Embryos at the 2-cell or 4-cell stages and 24-hour old embryos (late trocophore larvae) exhibited a Spi-OAR-specific amplified band detectable in a single round of PCR.

Figure 10. Absence of effect of octopamine on oocyte meiotic reinitiation as compared to serotonin and KCl. 5-HT (A) or KCl (B) was added, at indicated concentrations to oocytes either in presence (open symbols) or absence (filled symbols) of 10 μ M octopamine and GVBD was scored after 30 min. Mean results (\pm SD) (not shown when smaller than symbol) of four experiments with two different females are shown.



2.5 Discussion

Spi-OAR is the first octopamine receptor characterized from a bivalve mollusc and its greatest similarities, for both its sequence and signalling pathway, are with a sub-group of so-called “ β -adrenergic-like” octopamine receptors whose best known representatives are found in *Drosophila* and *Aplysia* (Evans and Maqueira, 2005). Earlier proposed classifications of octopamine receptors distinguished four groups called 1, 2A-B and 3 based on their pharmacological properties and signalling pathways, with class 1 inducing a Ca^{2+} rise and classes 2A-B and 3 stimulating adenylate cyclase and causing an increase of cAMP (Evans and Robb, 1993; Roeder, 1999). A subsequent classification proposed four sub-groups designated as “octopamine” receptors, *Aplysia*-type octopamine receptors, tyramine receptors and *Lymnaea* type II octopamine receptors (Pflüger and Stevenson, 2005; Roeder, 2005). The so-called *Aplysia*-type was a group composed of some incompletely characterized *Aplysia* and *Drosophila* octopamine receptors. Recent work provided full characterization of three *Drosophila* receptors belonging to this sub-group (Maqueira et al., 2005) and sharing an exclusive cAMP signalling similar to that of two *Aplysia* representative receptors (Chang et al., 2000). This sub-group was then renamed “ β -like” in a more recent classification to account for their similarity with their vertebrate adrenergic sister group (Evans and Maqueira, 2005). When comparing Spi-OAR to these closest *Aplysia californica* and *A. kurodai* octopamine receptors (Chang et al., 2000) and *Drosophila* receptors, the β -1, β -2, and β -3 octopamine receptors (Maqueira et al., 2005), it appears that it shares not only sequence similarities but also the typical exclusive signalling pathway consisting in a cAMP rise with no Ca^{2+} increase (Figs. 5-6, p.66-68). This subgroup of β -like octopamine receptors, to which Spi-OAR belongs, appears to differ significantly from the other subgroups comprising α -1 and α -2-adrenergic-like octopamine and tyramine receptors.

Our phylogenetic analysis, including other octopamine receptors and molluscan GPCRs strengthens the view of four distinguishable classes of octopamine receptors (α -1-like, α -2-like, β -like, and Cl^- -linked). Our proposed classification and designation (Fig. 3, p.62) differs only slightly from previous ones (Evans and Maqueira, 2005; Pfluger and Stevenson, 2005; Roeder, 2005) and groups receptors with common signalling pathways rather than preferred ligands, clustering the tyramine receptors in the α -2-like group (Fig. 3, p.62). The fourth group is represented by an unusual *Lymnaea* ionotropic Cl^- -linked octopamine receptor and also a related *C. elegans* receptor (TYRA-2) (Rex et al., 2005) that have no homologue in vertebrates and constitute a unique and separate invertebrate-specific evolution for these receptors. This stresses the fact that octopamine receptors are quite diverse from one to another. In addition, our β -like Spi-OAR appears closer to other *Aplysia* serotonin or dopamine receptors than to other α -1-like octopamine receptors from either insects or molluscs (Fig. 3, p.62).

Octopamine, although predominant in invertebrates and regulating a number of functions similar to those regulated by epinephrine or norepinephrine in vertebrates (Roeder, 2003), is found only in trace amounts in vertebrates (Borowsky et al., 2001). Octopamine is therefore seen as the invertebrate counterpart of epinephrine and norepinephrine and this is reflected in the designation of octopamine receptor classes. Interestingly, tyramine, which is the natural precursor of octopamine, is also often the best agonist of octopamine receptors and it was originally suspected that there might be no true tyramine receptors *per se* and several receptors were designated as composite tyramine/octopamine receptors. More recent work has unequivocally characterized a number of truly specific tyramine receptors (Cazzamali et al., 2005; Nagaya et al., 2002; Rotte et al., 2009; Saudou et al., 1990) and several tyramine-specific functions are progressively uncovered (Blenau and Baumann, 2001; Lange, 2009b; Roeder, 2005). In the locust, tyramine has reproductive functions complementing those of octopamine on spermathecal and oviductal muscles (da Silva

and Lange, 2008; Donini and Lange, 2004; Lange, 2009b). As more tyramine receptors become characterized, along with additional octopamine receptors from various invertebrates, the current classification of this family of GPCRs might change and become more accurate. This could also apply to other invertebrate GPCRs, such as serotonin (Tierney, 2001) or histamine (Roeder, 2003) receptors, that do not fit well current classifications mostly derived from mammalian receptors due, in part, to differing pharmacological profiles, or the absence of any true homologue receptors between invertebrate and vertebrate receptors. Dissimilar pharmacological profiles among closely related invertebrate receptors also contribute to the difficulty of making a proper classifications. This is seen with Spi-OAR that exhibits little similarity in its sensitivity to various agonists or antagonists with other octopamine receptors, including the most closely related *Drosophila* β -like receptors (Maqueira et al., 2005). Indeed, Spi-OAR order of potency for agonists does not fit any of the three *Drosophila* β -like (β -1, β -2, β -3) receptors while, among similar tested antagonists (Maqueira et al., 2005), none were efficient with Spi-OAR (Fig. 8, p.72). This result is somewhat surprising since this differing pharmacological profile does not corroborate the proximity of Spi-OAR to these *Drosophila* β -like receptors demonstrated by their sequence and identical cAMP-linked signalling. However, it is possible that our protocol using cells pre-stimulated with forskolin, before adding agonists or antagonists, was not optimal or sensitive enough to fully reveal Spi-OAR pharmacological profile especially for antagonists that were all inefficient. This approach is identical to that used with closely-related *Drosophila* β -like receptors (Maqueira et al., 2005) and this is why we also used it for easier comparison. It is also possible that the noted slight constitutive activity of Spi-OAR (Fig. 7, p.70) somewhat obscured its real pharmacological properties or interfered with our analyses of cAMP levels (Fig. 8, p.72).

In this respect, long thought to be an artefact of heterologous expression, constitutive activity of GPCRs, such as seen with Spi-OAR, is now considered as a

naturally occurring and biologically relevant phenomenon (Cotecchia, 2007; Milligan, 2003; Morisset et al., 2000). Other invertebrate GPCRs were seen to have constitutive activity *in vitro*, including a cnidarian *Renilla* orphan receptor (Bouchard et al., 2003), an *Aplysia* dopamine receptor (Barbas et al., 2006), and a *C. elegans* tyramine receptor (Rex et al., 2005), suggesting that this phenomenon occurs in lower invertebrates and was conserved during evolution. It remains to be demonstrated whether Spi-OAR has such a basal constitutive activity in native *Spisula* tissues where it is expressed and whether this affects its biological functions.

Despite the possibility that Spi-OAR's constitutive activity affects its pharmacological profile and might contribute to make it unique, this does not differ from other closely related receptors sharing little common pharmacological properties among them. For example, the three members (β -1, β -2, β -3) of *Drosophila* β -like octopamine receptors exhibit very different pharmacological profiles, despite their obvious relatedness in most other respects (Maqueira et al., 2005). Spi-OAR, although related to these *Drosophila* β -like receptors, exhibits the peculiarity that the agonist clonidine is more potent than naphazoline (Fig. 8, p.72), an uncommon property reported only for locust oviducts (Orchard and Lange, 1986) and corpora cardiaca (Pannabecker and Orchard, 1986). Despite this observation, and even though relevant studies are scarce, it seems that the observed overall Spi-OAR pharmacological profile (Fig. 8, p.72) does not compare well with most octopamine or tyramine receptors studied in this respect (Evans and Robb, 1993). This concurs with the view that the variability in pharmacological properties of octopamine receptors makes it difficult to define any strong relationships between them based on this criterion. More generally, this might simply reflect that the battery of currently available agonists and antagonists, not only for octopamine receptors but also for any given invertebrate GPCR, is not as extensive or accurate as that available for mammalian GPCRs, therefore resulting in apparent pharmacological variability.

Our RT-PCR analysis of Spi-OAR mRNA revealed a ubiquitous expression in all examined tissues (Fig. 9, p.74), opening up the possibility of a vast array of physiological functions for Spi-OAR. Surprisingly, even though the original PCR-amplified short sequence between TM-3 and TM-7 originated from oocyte cDNAs, these cells were found to have little Spi-OAR mRNAs as compared to other tissues or embryos from the 2-cell stage up to 24 hour-old. This apparent increase in Spi-OAR mRNA during early development may rather reflect its increased accessibility to isolation and reverse transcription possibly associated to the translational remodelling known to occur rapidly after fertilization with maternal mRNAs becoming “unmasked” in the absence of transcription (Rosenthal et al., 1980; Rosenthal and Ruderman, 1987). The persistence of Spi-OAR mRNA in 24-hour old embryos (Fig. 9) indicates that it is not degraded during the maternal-zygotic transition in genome expression that progressively occurs during this period. We do not know when octopamine starts being produced in *Spisula* developing embryos but serotonin immunoreactivity was detected as early as 20 hours after fertilization in trocophore larvae (Masseau and Dubé, unpublished observations; Kreiling et al., 2001), similar to other bivalve larvae such as *Mytilus* (Voronezhskaya et al., 2008). In addition, dopamine and norepinephrine were detected in *Spisula* 24-hour-old embryos (Kreiling et al., 2001). If octopamine is produced at about the same period, the persistence of Spi-OAR mRNA up to that time would make these early larvae already responsive with proper receptors to the produced ligand. A possible early function of octopamine could then be in neural development or larval motility as known for catecholamines and serotonin in related species (Beiras and Widdows, 1995), a possibility that has never been examined to our knowledge, but deserves future considerations.

On the other hand, the presence of Spi-OAR mRNA in all tissues examined (Fig. 9, p.74) parallels the reported pattern of expression of a tyramine receptor mRNA in *Periplaneta americana* (Rotte et al., 2009), an octopamine/tyramine

receptor mRNA in the locust (Molaei et al., 2005), and the “OAMB” octopamine receptor mRNA of *Drosophila* also found in various tissues (Lee et al., 2003). The latter *Drosophila* OAMB receptor has a clearly demonstrated function in reproductive activities but is likely to play additional roles in the central nervous system and other tissues where it is also present. Likewise, Spi-OAR might have reproductive functions even though other roles remain open possibilities with its mRNA present in gills, heart and foot in addition to ganglia, gonads, oocytes and embryos (Fig. 9, p.74).

Since serotonin is very efficient in inducing meiosis reinitiation in isolated *Spisula* oocytes through putative oocyte serotonin receptors (Krantic et al., 1991; Krantic et al., 1993), we tested the possibility that octopamine might also influence the meiotic process through Spi-OAR or another octopamine receptor. As observed, octopamine, unlike serotonin, had no effect in inducing or inhibiting GVBD, the first step of meiotic activation (Fig. 10, p.76). This suggests that, despite the presence of Spi-OAR mRNA, the receptor protein itself is not expressed in oocytes or that activating it with octopamine does not result in meiotic activation. Interestingly, when serotonin is added to oocytes, it induces, along with an essential Ca^{2+} surge, an increase of cAMP that are thought to be important components of induced meiotic reinitiation (Yi et al., 2002). If Spi-OAR protein is expressed in *Spisula* oocytes, it would be expected that octopamine triggers only an increase of cAMP without any Ca^{2+} surge if similar to what happens in Spi-OAR-transfected mammalian host cells (Figs. 5-6, p.66-68) which would explain the absence of GVBD (Fig. 10, p.76). In future investigations, a possible test for the presence of the receptor itself would be to measure the levels of cAMP after adding octopamine to oocytes. However, Spi-OAR possible reproductive function might rather be in the spawning process, at the level of the gonad, as also suggested for serotonin. Indeed, the *Spisula* female gonad contains a network of serotonin-immunoreactive fibers surrounding the acini containing the oocytes and presumed to release serotonin and trigger the release of gametes in the

spawning process (Masseau et al., 2002). The possibility that octopamine is also involved in the control of spawning in *Spisula*, in concert with serotonin, would be reminiscent of the dual complementary function of these amines in the control of oviductal contractions in the locust (Lange, 2004; Lange, 2009a). Another analogy may be drawn with the function of octopamine in the *Drosophila* reproductive system through the OAMB receptor since this receptor's main function appears to be at the level of the oviduct (Lee et al., 2009) in the egg-laying process itself even though it appears also present in oocytes (Lee et al., 2003).

Additional work will be required to reveal the possible functions of octopamine in reproduction and other biological processes in invertebrates. This first characterized octopamine receptor from a bivalve mollusc, Spi-OAR, represents a new member of the β -adrenergic-like subgroup and contributes an interesting evolutive perspective while providing an alternative animal model in addition to insects and gastropod molluscs most often studied.

2.6 Acknowledgements

Sylvie Legault is acknowledged for technical assistance in initial steps leading to the full sequence of Spi-OAR. Ghislain Cummings (Magdalen Islands, Quebec) is also gratefully acknowledged for collecting clams by scuba diving and having provided us with ripe specimens for over 20 seasons. François-Joseph Lapointe and Véronique Campbell provided invaluable assistance in our phylogentic analysis. Thanks are due to Drs Annie Angers and Euridice Carmona for critical reading of the manuscript. This work was supported by a Natural Sciences and Engineering Research Council (NSERC-Canada) discovery grant to F.D.

2.7 References

- Allen, R. D., 1953. Fertilization and artificial activation in the egg of the surf clam *Spisula solidissima*. Biol. Bull. 105, 213-239.
- Barbas, D., Zappulla, J. P., Angers, S., Bouvier, M., Mohamed, H. A., Byrne, J. H., Castellucci, V. F., DesGroseillers, L., 2006. An aplysia dopamine1-like receptor: molecular and functional characterization. J. Neurochem. 96, 414-427.
- Beiras, R., Widdows, J., 1995. Effect of the neurotransmitters dopamine, serotonin and norepinephrine on the ciliary activity of mussel (*Mytilus edulis*) larvae. Mar. Biol. 122, 597-603.
- Blenau, W., Baumann, A., 2001. Molecular and pharmacological properties of insect biogenic amine receptors: lessons from *Drosophila melanogaster* and *Apis mellifera*. Arch. Insect Biochem. Physiol. 48, 13-38.
- Borowsky, B., Adham, N., Jones, K. A., Raddatz, R., Artymyshyn, R., Ogozalek, K. L., Durkin, M. M., Lakhani, P. P., Bonini, J. A., Pathirana, S., Boyle, N., Pu, X., Kouranova, E., Lichtblau, H., Ochoa, F. Y., Branchek, T. A., Gerald, C., 2001. Trace amines: identification of a family of mammalian G protein-coupled receptors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98, 8966-8971.

- Bouchard, C., Ribeiro, P., Dubé, F., Anctil, M., 2003. A new G protein-coupled receptor from a primitive metazoan shows homology with vertebrate aminergic receptors and displays constitutive activity in mammalian cells. *J. Neurochem.* 86, 1149-1161.
- Cazzamali, G., Klaerke, D. A., Grimmelikhuijzen, C. J., 2005. A new family of insect tyramine receptors. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 338, 1189-1196.
- Chang, D. J., Li, X. C., Lee, Y. S., Kim, H. K., Kim, U. S., Cho, N. J., Lo, X., Weiss, K. R., Kandel, E. R., Kaang, B. K., 2000. Activation of a heterologously expressed octopamine receptor coupled only to adenylyl cyclase produces all the features of presynaptic facilitation in *Aplysia* sensory neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 1829-1834.
- Clark, J., Lange, A. B., 2003. Octopamine modulates spermathecal muscle contractions in *Locusta migratoria*. *J. Comp. Physiol. [A]* 189, 105-114.
- Colas, P., Dubé, F., 1998. Meiotic maturation in mollusc oocytes. *Semin. Cell Dev. Biol.* 9, 539-548.
- Costello, D. P., Henley, C., 1971. Methods for obtaining and handling marine eggs and embryos. Marine Biological Laboratory, Woods Hole, Ma.
- Cotecchia, S., 2007. Constitutive activity and inverse agonism at the α_1 adrenoceptors. *Biochem. Pharmacol.* 73, 1076-1083.
- Crocker, A., Sehgal, A., 2008. Octopamine regulates sleep in drosophila through protein kinase A-dependent mechanisms. *J. Neurosci.* 28, 9377-9385.

- da Silva, R., Lange, A. B., 2008. Tyramine as a possible neurotransmitter/neuromodulator at the spermatheca of the African migratory locust, *Locusta migratoria*. *J. Insect Physiol.* 54, 1306-1313.
- Donini, A., Lange, A. B., 2004. Evidence for a possible neurotransmitter/neuromodulator role of tyramine on the locust oviducts. *J. Insect Physiol.* 50, 351-361.
- Evans, P. D., Robb, S., 1993. Octopamine receptor subtypes and their modes of action. *Neurochem. Res.* 18, 869-874.
- Evans, P. D., Maqueira, B., 2005. Insect octopamine receptors: a new classification scheme based on studies of cloned *Drosophila* G-protein coupled receptors. *Invert. Neurosci.* 5, 111-118.
- Feinmesser, R., Miyazaki, I., Cheung, R., Freeman, J. L., Noyek, A. M., Dosch, H. M., 1992. Diagnosis of nasopharyngeal carcinoma by DNA amplification of tissue obtained by fine-needle aspiration. *N. Engl. J. Med.* 326, 17-21.
- Fraser, C. M., Chung, F. Z., Wang, C. D., & Venter, J. C., 1988. Site-directed mutagenesis of human beta-adrenergic receptors: substitution of aspartic acid-130 by asparagine produces a receptor with high-affinity agonist binding that is uncoupled from adenylate cyclase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 85, 5478-5482.
- Gerhardt, C. C., Bakker, R. A., Piek, G. J., Planta, R. J., Vreugdenhil, E., Leysen, J. E., Van Heerikhuizen, H., 1997a. Molecular cloning and pharmacological characterization of a molluscan octopamine receptor. *Mol. Pharmacol.* 51, 293-300.

- Gerhardt, C. C., Lodder, H. C., Vincent, M., Bakker, R. A., Planta, R. J., Vreugdenhil, E., Kits, K. S., van Heerikhuizen, H., 1997b. Cloning and expression of a complementary DNA encoding a molluscan octopamine receptor that couples to chloride channels in HEK293 cells. *J. Biol. Chem.* 272, 6201-6207.
- Han, K. A., Millar, N. S., Davis, R. L., 1998. A novel octopamine receptor with preferential expression in *Drosophila* mushroom bodies. *J. Neurosci.* 18, 3650-3658.
- Hirai, S., Kishimoto, T., Kadam, A. L., Kanatani, H., Koide, S. S., 1988. Induction of spawning and oocyte maturation by 5-hydroxytryptamine in the surf clam. *J. Exp. Zool.* 245, 318-321.
- Hoyer, S. C., Eckart, A., Herrel, A., Zars, T., Fischer, S. A., Hardie, S. L., Heisenberg, M., 2008. Octopamine in male aggression of *Drosophila*. *Curr. Biol.* 18, 159-167.
- Krantic, S., Dubé, F., Quirion, R., Guerrier, P., 1991. Pharmacology of the serotonin-induced meiosis reinitiation in *Spisula solidissima* oocytes. *Dev. Biol.* 146, 491-498.
- Krantic, S., Guerrier, P., Dubé, F., 1993. Meiosis reinitiation in surf clam oocytes is mediated via a 5-hydroxytryptamine5 serotonin membrane receptor and a vitelline envelope-associated high affinity binding site. *J. Biol. Chem.* 268, 7983-7989.

- Kreiling, J. A., Jessen-Eller, K., Miller, J., Seegal, R. F., Reinisch, C. L., 2001. Early development of the serotonergic and dopaminergic nervous system in *Spisula solidissima* (surf clam) larvae. *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.* 130, 341-351.
- Kurten, R. C., 2003. Sorting motifs in receptor trafficking. *Adv. Drug Deliver. Rev.* 55, 1405-1419.
- Lange, A. B., 2004. A neurohormonal role for serotonin in the control of locust oviducts. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 56, 179-190.
- Lange, A. B., da Silva, R., 2007. Neural and hormonal control of muscular activity of the spermatheca in the locust, *Locusta migratoria*. *Peptides* 28, 174-184.
- Lange, A. B., 2009a. Tyramine: from octopamine precursor to neuroactive chemical in insects. *Gen. Comp. Endocrinol.* 162, 18-26.
- Lange, A. B., 2009b. Neural mechanisms coordinating the female reproductive system in the locust. *Front. Biosci.* 14, 4401-4415.
- Lee, H. G., Seong, C. S., Kim, Y. C., Davis, R. L., Han, K. A., 2003. Octopamine receptor OAMB is required for ovulation in *Drosophila melanogaster*. *Dev. Biol.* 264, 179-190.
- Lee, H. G., Rohila, S., Han, K. A., 2009. The octopamine receptor OAMB mediates ovulation via Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II in the *Drosophila* oviduct epithelium. *PloS One* 4, e4716.

- Maqueira, B., Chatwin, H., Evans, P. D., 2005. Identification and characterization of a novel family of *Drosophila* beta-adrenergic-like octopamine G-protein coupled receptors. *J. Neurochem.* 94, 547-560.
- Masseau, I., Bannon, P., Anctil, M., Dubé, F., 2002. Localization and quantification of gonad serotonin during gametogenesis of the surf clam, *Spisula solidissima*. *Biol. Bull.* 202, 23-33.
- Milligan, G., 2003. Constitutive activity and inverse agonists of G protein-coupled receptors: a current perspective. *Mol. Pharmacol.* 64, 1271-1276.
- Molaei, G., Paluzzi, J. P., Bendena, W. G., Lange, A. B., 2005. Isolation, cloning, and tissue expression of a putative octopamine/tyramine receptor from locust visceral muscle tissues. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 59, 132-149.
- Monastirioti, M., Linn, C. E., Jr., White, K., 1996. Characterization of *Drosophila* tyramine beta-hydroxylase gene and isolation of mutant flies lacking octopamine. *J. Neurosci.* 16, 3900-3911.
- Monastirioti, M., 2003. Distinct octopamine cell population residing in the CNS abdominal ganglion controls ovulation in *Drosophila melanogaster*. *Dev. Biol.* 264, 38-49.
- Morisset, S., Rouleau, A., Ligneau, X., Gbahou, F., Tardivel-Lacombe, J., Stark, H., Schunack, W., Ganellin, C. R., Schwartz, J. C., Arrang, J. M., 2000. High constitutive activity of native H3 receptors regulates histamine neurons in brain. *Nature* 408, 860-864.

- Nagaya, Y., Kutsukake, M., Chigusa, S. I., Komatsu, A., 2002. A trace amine, tyramine, functions as a neuromodulator in *Drosophila melanogaster*. *Neurosci. Lett.* 329, 324-328.
- Nykamp, D. A., Lange, A. B., 2000. Interaction between octopamine and proctolin on the oviducts of *Locusta migratoria*. *J. Insect Physiol.* 46, 809-816.
- Oliveira, L., Paiva, A. C., Vriend, G., 1999. A low resolution model for the interaction of G proteins with G protein-coupled receptors. *Prot. Eng.* 12, 1087-1095.
- Orchard, I., Lange, A. B., 1985. Evidence for octopaminergic modulation of an insect visceral muscle. *J. Neurobiol.* 16, 171-181.
- Orchard, I., Lange, A. B., 1986. Pharmacological profile of octopamine receptors on the lateral oviducts of the locust, *Locusta-migratoria*. *J. Insect Physiol.* 32, 741-745.
- Pannabecker, T., Orchard, I., 1986. Pharmacological properties of octopamine-2 receptors in locust neuroendocrine tissue. *J. Insect Physiol.* 32, 909-915.
- Pfluger, H. J., Stevenson, P. A., 2005. Evolutionary aspects of octopaminergic systems with emphasis on arthropods. *Arthropod Struct. Dev.* 34, 379-396.
- Rex, E., Hapiak, V., Hobson, R., Smith, K., Xiao, H., Komuniecki, R., 2005. TYRA-2 (F01E11.5): a *Caenorhabditis elegans* tyramine receptor expressed in the MC and NSM pharyngeal neurons. *J. Neurochem.* 94, 181-191.
- Roeder, T., 1999. Octopamine in invertebrates. *Prog. Neurobiol.* 59, 533-561.

- Roeder, T., 2003. Metabotropic histamine receptors--nothing for invertebrates? Eur. J. Pharmacol. 466, 85-90.
- Roeder, T., 2005. Tyramine and octopamine: ruling behavior and metabolism. Annu. Rev. Entomol. 50, 447-477.
- Rosenthal, E. T., Hunt, T., Ruderman, J. V., 1980. Selective translation of mRNA controls the pattern of protein synthesis during early development of the surf clam, *Spisula solidissima*. Cell 20, 487-494.
- Rosenthal, E. T., Ruderman, J. V., 1987. Widespread changes in the translation and adenylation of maternal messenger RNAs following fertilization of *Spisula* oocytes. Dev. Biol. 121, 237-246.
- Rotte, C., Krach, C., Balfanz, S., Baumann, A., Walz, B., Blenau, W., 2009. Molecular characterization and localization of the first tyramine receptor of the American cockroach (*Periplaneta americana*). Neuroscience 162, 1120-1133.
- Saudou, F., Amlaiky, N., Plassat, J. L., Borrelli, E., Hen, R., 1990. Cloning and characterization of a *Drosophila* tyramine receptor. EMBO J. 9, 3611-3617.
- Spence, P., Bard, J., Jones, P., Betty, M., 1998. The identification of G-protein coupled receptors in sequence databases. Exp. Opin. Ther. Pat. 8, 235-247.
- Tierney, A. J., 2001. Structure and function of invertebrate 5-HT receptors: a review. Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol. 128, 791-804.

- Tusnady, G. E., Simon, I., 2001. The HMMTOP transmembrane topology prediction server. *Bioinformatics* 17, 849-850.
- Voronezhskaya, E. E., Nezlin, L. P., Odintsova, N. A., Plummer, J. T., Croll, R. P., 2008. Neuronal development in larval mussel *Mytilus trossulus* (Mollusca : Bivalvia). *Zoomorphology* 127, 97-110.
- Yi, J. H., Lefievre, L., Gagnon, C., Anctil, M., Dubé, F., 2002. Increase of cAMP upon release from prophase arrest in surf clam oocytes. *J. Cell Sci.* 115, 311-320.
- Zhou, C., Rao, Y., Rao, Y., 2008. A subset of octopaminergic neurons are important for *Drosophila* aggression. *Nat. Neurosci.* 11, 1059-1067.

3. DISCUSSION GÉNÉRALE ET CONCLUSION

La majorité des études portant sur les OAR font appel aux insectes comme modèle expérimental, en particulier la drosophile dont le génome a été complètement séquencé. Ces études mettent en évidence le potentiel éventuel des OAR comme cible intéressante dans le développement de nouveaux insecticides. En revanche, la caractérisation de Spi-OAR chez un mollusque bivalve, un modèle animal pour la première fois employé dans ce champ de recherche, va permettre une compréhension plus générale de ces récepteurs membranaires dans le règne animal selon une perspective évolutionnaire, tout en fournissant des données supplémentaires en ce qui concerne les OAR des lophotrochozoaires notamment pour l'embranchement des mollusques. D'ailleurs, Spi-OAR est le premier récepteur aminergique à OA à être cloné, séquencé et caractérisé entièrement chez un mollusque pélécyopode, la palourde *Spisula solidissima*. Les objectifs principaux de ce mémoire consistaient à faire la caractérisation pharmacologique de base de ce nouveau RCPG en confirmant le ligand naturel, la voie de signalisation, le portrait pharmacologique ainsi que la localisation de l'ARNm dans les différents tissus et stades embryonnaires. Bref, Spi-OAR correspond à un récepteur membranaire couplé à une protéine Gs qui engendre une augmentation de l'AMPc intracellulaire lorsque stimulé avec l'OA.

3.1 Les motifs conservés

Il est tout d'abord intéressant de noter la présence de certains résidus et motifs très conservés et typiquement caractéristiques de la famille 1 « Rhodopsin-like » localisés au niveau des sept passages transmembranaires de la séquence peptidique de Spi-OAR (Spence et al., 1998) (Fig. 1, p.58). Ces résidus et ces motifs fortement préservés au cours de l'évolution jouent des rôles clés dans le fonctionnement des RCPG, par exemple lors de la liaison avec le ligand et lors de l'activation du

récepteur. D'ailleurs, le motif D134RY est retrouvé dans la séquence de Spi-OAR ainsi que dans la grande majorité des RCPG et il est potentiellement impliqué dans la liaison de l'agoniste, dans la conformation structurale du récepteur et dans le processus d'activation du récepteur (Fraser et al., 1988). Les motifs L79-X-X-X-D et N327-P-X-X-Y (Oliveira et al., 1999) sont présents principalement chez les récepteurs adrénergiques et ils contribueraient à l'internalisation du récepteur activé par le ligand (Kurten, 2003). De façon générale, l'observation de tous ces motifs conservés au niveau de la séquence primaire de Spi-OAR met en évidence l'impressionnante conservation structurale des RCPG et supporte l'idée d'une apparition précoce de ces récepteurs membranaires au cours de l'évolution. Le processus de transduction du signal via les RCPG est sans doute un des plus anciens mécanismes de communication transmembranaire (Bockaert et Pin, 1999). La séquence primaire de Spi-OAR révèle également des résidus caractéristiques des récepteurs aux catécholamines. D'ailleurs, le motif P291-F-F est localisé dans le TM-VI au niveau du site de liaison où les catécholamines sont capables d'une interaction hydrophobe avec leur anneau aromatique (Spence et al., 1998). Le deuxième F de ce motif est caractéristique des récepteurs à catécholamine, à 5-HT et à histamine. De plus, les motifs V118-L et S206-S-S sont typiquement retrouvés chez les récepteurs à catécholamine (Spence et al., 1998) et la série des trois sérines est susceptible de jouer un rôle lors des liaisons hydrogènes avec les catécholamines (Spence et al., 1998). Ces motifs caractéristiques des récepteurs à catécholamine sont également observables chez d'autres OAR. En effet, les récepteurs Pa oa1 (Bischof et Enan, 2004), OAMB (Han et al., 1998), Lym oa1 (Gerhardt et al., 1997a), AmOA1 (Grohmann, et al., 2003) et K50Hel (von Nickisch-Rosenegk al., 1996) contiennent le motif P-F-F. Par la suite, les récepteurs Ap oa1 (Chang et al., 2000) et Lym oa2 (Gerhardt et al., 1997b) sont caractérisés par le motif V-L. Finalement, les récepteurs Ap oa1 (Chang et al., 2000), K50Hel (von Nickisch-Rosenegk al., 1996) et Lym oa2 (Gerhardt et al., 1997b) détiennent le motif S-S-S. Toutes ces observations au niveau des séquences en acides aminés suggèrent que ces motifs ne sont pas uniquement

restreints aux récepteurs à catécholamine et qu'ils sont conservés également chez certains OAR.

3.2 Les voies de signalisation

Initialement, différentes expériences ont été réalisées dans le but de déterminer le ligand potentiel de Spi-OAR. Les résultats démontrent qu'une expression transitoire dans les cellules HEK 293 engendre une augmentation du niveau d'AMPC sans élévation du Ca^{2+} intracellulaire lors d'une stimulation avec de l'OA et, dans une moindre mesure, avec la tyramine (Fig. 5-6, p.66-68). Il est plausible que la tyramine soit un agoniste partiel *in vivo* avec une faible affinité pour Spi-OAR. Cette légère activation par la tyramine est également observée chez d'autres OAR caractérisés comme le récepteur Pa oa1 chez la blatte (*Periplaneta americana*) (Bischof et Enan, 2004), les deux récepteurs Ap oa1 chez l'aplysie (*Aplysia californica* et *Aplysia kurodai*) (Chang et al., 2000) et le récepteur OAMB chez la drosophile (*Drosophila melanogaster*) (Han et al., 1998). Il va de soi que la similarité de la structure moléculaire de ces deux amines biogènes supporte l'idée que la tyramine soit un agoniste partiel *in vivo* pour certains OAR, notamment pour Spi-OAR. Il est maintenant fortement suggéré que la tyramine, le précurseur de l'OA, soit une molécule active possédant des rôles fonctionnels (Blenau et Baumann, 2001; Lange, 2009b; Roeder, 2005) via des RCPG comme agoniste, partiel ou complet (Lange, 2009b). En effet, il est démontré que la tyramine possède des récepteurs qui lui sont propres (Cazzamali et al., 2005; Nagaya et al., 2002; Rotte et al., 2009; Saudou et al., 1990) tels le récepteur Amtyr1 chez l'abeille (*Apis mellifera*) (Blenau et al., 2000), le récepteur Tyr-dro chez la drosophile (*Drosophila melanogaster*) (Saudou et al., 1990) et le récepteur Tyr-Loc chez la locuste (*Locusta migratoria*) (Vanden Broeck et al., 1995).

3.3 L'expression hétérologue

Dans le cadre de ce mémoire, nous avons opté pour l'utilisation des cellules HEK 293, une lignée cellulaire permanente fréquemment utilisée pour la caractérisation de nouveaux RCPG et qui permet l'induction d'une variété de voies de signalisation via la propriété intrinsèque de chaque récepteur exogène exprimé. En effet, plusieurs récepteurs caractérisés d'invertébrés utilisent des voies de signalisation distinctives lorsque transfectés dans ces cellules hôtes soit en augmentant l'AMPc (Barbas et al., 2005; Chang et al., 2000), soit en diminuant l'AMPc (Angers et al., 1998), soit en permettant une élévation du Ca^{2+} intracellulaire (Li et al., 1995), soit en engendrant simultanément une hausse du Ca^{2+} intracellulaire et d'AMPc (Bischof et Enan, 2004; Gerhardt et al., 1997a) ou en occasionnant un courant chlorique (Gerhardt et al., 1997b). De plus, la lignée cellulaire HEK 293 de mammifère ne montre pas d'expression endogène d'OAR. Par exemple, aucune augmentation d'AMPc n'a été observée lors d'une stimulation avec de l'OA pour les cellules HEK 293 transfectées avec un récepteur à dopamine (DAMB) de drosophile (Han et al., 1996). En revanche, certaines cellules hôtes d'insectes expriment des OAR endogènes telle la lignée cellulaire Sf9 dérivée de l'insecte *Spodoptera frugiperda* (Orr et al., 1992). Il est par contre important de mentionner qu'en conditions *in vitro* et exprimé dans la lignée cellulaire hétérologue HEK 293, le récepteur OAMB a engendré une élévation du Ca^{2+} intracellulaire ainsi qu'une hausse d'AMPc suite à une stimulation avec de l'OA (Han et al., 1998). Il a été suggéré par la suite que cette faible élévation d'AMPc soit possiblement un effet indirect non physiologique induit par de fortes concentrations d'OA ($>10^{-6}$ M) (Balfanz et al., 2005). Le récepteur OAMB engendre une élévation du Ca^{2+} intracellulaire avec un faible niveau d'AMPc lorsqu'il est incubé avec des concentrations entre 10^{-8} M et 10^{-6} M d'OA. Ce phénomène a également été observé pour un OAR d'abeille (Grohmann et al., 2003). En ce qui concerne Spi-OAR, une élévation quatre fois plus importante de l'AMPc a été obtenue lors d'une stimulation avec 10^{-6} M d'OA.

À des fins de comparaison, deux vecteurs d'expression (pcDNA3.1 et pCEP4) ainsi que deux lignées cellulaires (HEK 293 et ovaires d'hamster chinois (CHO)) ont été utilisés lors d'une expérience dont les résultats en duplicata sont brièvement et uniquement présentés dans cette partie du mémoire. Ces deux lignées cellulaires ont été transfectées transitoirement avec les deux types de construction vectorielle pCEP4-Spi-OAR et pcDNA-Spi-OAR. Lors de l'expression de Spi-OAR dans ces différentes conditions, l'application de l'OA à 1 μ M et à 10 μ M occasionne dans tous les cas une hausse du niveau d'AMPc. En effet, les cellules HEK 293 transfectées avec pCEP4-Spi-OAR engendrent un niveau d'AMPc 3.5 fois (1 μ M OA) et 3.9 fois (10 μ M OA) plus élevé comparativement au contrôle. Les cellules HEK 293 transfectées avec pcDNA-Spi-OAR induisent un niveau d'AMPc 2.7 fois (1 μ M OA) et 2.2 fois (10 μ M OA) plus important comparativement au contrôle. Les cellules CHO transfectées avec pCEP4-Spi-OAR occasionnent un niveau d'AMPc 1.6 fois (1 μ M OA) et 1.8 fois (10 μ M OA) plus élevé comparativement au contrôle. Finalement, les cellules CHO transfectées avec pcDNA-Spi-OAR produisent un niveau d'AMPc 1.3 fois (1 μ M OA) et 1.5 fois (10 μ M OA) plus important comparativement au contrôle. Les différences entre les degrés d'élévation d'AMPc obtenus lors de ces différentes conditions expérimentales peuvent être expliquées par des variations au niveau de l'efficacité des transfections transitoires. Par ailleurs, ces résultats provenant d'une seule expérience en duplicata suggèrent que Spi-OAR n'induit potentiellement *in vivo* qu'une voie de signalisation via une protéine Gs. Cette hausse d'AMPc ne serait conséquemment pas reliée à des propriétés intrinsèques d'une lignée cellulaire ou d'un vecteur en particulier, mais manifestement attribuable à l'expression de Spi-OAR dans les cellules hôtes et à sa capacité de coupler spécifiquement une protéine Gs.

En outre, il est probable qu'une lignée cellulaire, différente de celles utilisées dans ce projet, puisse produire une réponse signalétique d'intensité autre lorsque transfectée avec Spi-OAR. En effet, une étude portant sur un récepteur à tyramine

chez la drosophile et un récepteur à dopamine chez la souris a démontré des réponses pharmacologiques plus importantes ainsi qu'une meilleure reproductibilité des mesures d'AMPc lors de transfections avec la lignée cellulaire de fibroblastes embryonnaires de souris (NIH 3T3) comparativement aux transfections avec la lignée Cos-7 («CV-1 in Origin and carrying SV-40») soit les cellules rénales de singes africains qui n'ont induit aucun changement reproductible du niveau d'AMPc (Saudou et al., 1990). Il n'est pas improbable qu'un environnement artificiel altère l'activation d'un récepteur et le déclenchement de sa voie de signalisation, nous amenant à nous questionner à propos du fonctionnement normal d'un récepteur dans un système hétérologue. Bref, la caractérisation de Spi-OAR *in vitro* sous-entend qu'il utilise la voie de signalisation via une protéine Gs *in vivo* dans les tissus de la palourde.

3.4 L'immunofluorescence

La procédure d'immunofluorescence a permis d'observer Spi-OAR au niveau de la membrane cellulaire, localisation caractéristique des RCPG. Cette détection de fluorescence a été possible grâce à un épitope ajouté au segment N-terminal de Spi-OAR reconnaissable par un anticorps commercial. Un signal de fluorescence reproductible pour 15 à 30% des cellules HEK 293 transfectées transitoirement avec Spi-OAR a confirmé l'efficacité des manipulations effectuées (Fig. 4, p.64). L'expression membranaire ainsi que l'efficacité de la transduction du signal pour ce récepteur d'invertébré, dans des cellules de mammifères, souligne également l'importante conservation des mécanismes de signalisation des RCPG entre les espèces. Inversement, certains récepteurs de vertébrés s'expriment et fonctionnent normalement dans des cellules d'organismes plus primitifs. Par exemple, l'ADNc d'un récepteur à opioïde μ d'humain a été cloné et a été exprimé efficacement dans des cellules d'insectes Sf9 (Kempf et al., 2002). Plusieurs autres études démontrent

qu'un RCPG peut être exprimé adéquatement dans des cellules d'organismes phylogénétiquement distants.

3.5 L'activité constitutive

En ce qui concerne l'activité constitutive, ce phénomène biologique et naturel (Cotecchia, 2007; Milligan, 2003; Morisset et al., 2000) est présent chez divers organismes pour plusieurs récepteurs aminergiques (Pauwels et Wurch, 1998). D'ailleurs, cette activité spontanée a été rapportée chez certains RCPG d'invertébrés exprimés dans un système hétérologue, par exemple le récepteur à dopamine (AmDop1) chez *Aplysia* (Barbas et al., 2006), le récepteur orphelin (Ren 1) chez *Renilla* (Bouchard et al., 2003) et le récepteur à tyramine (Tyr-2) chez *C. elegans* (Rex et al., 2005). Ces exemples de récepteurs d'invertébrés suggèrent que l'activité constitutive soit également présente chez les organismes primitifs et qu'elle soit conservée au cours de l'évolution. Selon le modèle du complexe ternaire étendu, le récepteur Spi-OAR aurait par conséquent une conformation spontanément activée sans liaison avec l'OA (Lefkowitz et al., 1993) (Fig. 7, p.70). Cette observation ne nous permet cependant pas de savoir si ce phénomène constitutif est réellement présent *in vivo* et s'il participe à la fonction biologique de Spi-OAR, par exemple au niveau de la régulation de l'activité basale du récepteur (Lefkowitz et al., 1993). Il est conséquemment suggéré pour des expériences futures d'examiner si l'activité constitutive de Spi-OAR est inhibée *in situ* lors de l'application d'agoniste inverse à OA sur des préparations tissulaires de palourde, et ce, en quantifiant le niveau d'AMPc.

3.6 L'analyse phylogénétique

L'OA possède un rôle majeur chez les invertébrés et ses fonctions physiologiques sont similaires à la noradrénaline chez les vertébrés (Roeder et al., 2003). Ces deux molécules neuroactives ne différant que par un groupement hydroxyle (Fig. 6, p.17) possèdent des rôles comparables au niveau des tissus périphériques (Roeder, 1999). Par exemple, ces deux hormones de stress permettent à l'animal de répondre rapidement lors de comportements de combat et de fuite (Roeder, 1999). D'autre part, ils occasionnent le déclenchement de la glycogénolyse, des contractions musculaires et de la mobilisation de l'énergie lors de comportements de combat et lors de réactions de sursaut (Roeder, 1999). L'analyse phylogénétique de ce mémoire s'est par conséquent basée sur la similarité de séquence entre les OAR et les récepteurs adrénergiques de mammifères (Fig. 3, p.62). Les classifications antérieures portant sur les récepteurs à octopamine/tyramine, résumées dans le tableau I (p.25) (Pflüger et Stevenson, 2005 ; Roeder, 2005) et II (p.26) (Evans et Maqueira, 2005), comportent des groupements sensiblement comparables à ceux observés dans notre phylogramme qui renferme uniquement des récepteurs caractérisés dont la voie de signalisation est connue *in vitro*. En effet, il apparaît opportun de tenir compte davantage des voies de signalisation induites pour chaque récepteur sélectionné. Notre analyse suggère que les OAR auraient subi une divergence évolutive précoce, et ce, pour former quatre sous-groupes distincts nommés « β -adrenergic-like », « $\alpha 1$ -adrenergic-like », « $\alpha 2$ -adrenergic-like » et « CI-linked ». Spi-OAR est inclus dans le sous-groupe appelé « β -adrenergic-like » et montre un fort pourcentage de similarité avec les deux récepteurs d'aplysie (Ap oa1(Ac) et Ap oa1(Ak)) (Chang et al., 2000), avec les trois récepteurs de drosophile (DmOct β 1, DmOct β 2 et DmOct β 3) (Evans et Maqueira, 2005) ainsi qu'avec le récepteur β -adrénergique de vertébré. Tous ces récepteurs appartenant au sous-groupe « β -adrenergic-like » activent la même voie de signalisation via une élévation de l'AMPc sans fluctuation du Ca^{2+} intracellulaire et se distinguent énormément des

trois autres sous-groupes. De façon inattendue, Spi-OAR possède davantage de similarité avec des récepteurs aminergiques à 5-HT d'aplysie (Ap5-HT1B1) (Li et al., 1995) et à dopamine d'aplysie (Apdop1) (Barbas et al., 2006) qu'avec les autres OAR d'insectes ou de mollusques n'appartenant pas au sous-groupe « β -adrenergic-like » (Fig. 2, p.60). Cette observation appuie l'existence de plusieurs sous-types d'OAR ayant évolué séparément, particulièrement le groupe « Cl⁻-linked » qui ne possède aucun groupe sœur adrénergique.

De manière générale, il est difficile d'établir une classification définitive en ce qui concerne les différents sous-types d'OAR dû à la variabilité des profils pharmacologiques ou à l'absence de récepteur homologue véritable de vertébrés. À titre de comparaison, les classifications concernant les récepteurs à 5-HT (Tierney, 2001) et les récepteurs à histamine (Roeder, 2003) d'invertébrés font également un parallèle avec les récepteurs homologues de vertébrés. Par exemple, l'histamine possède des implications majeures comme neurotransmetteur autant chez les invertébrés que chez les vertébrés (Roeder, 2003). Les récepteurs à histamine ionotropiques et métabotropiques sont bien connus chez les vertébrés, mais seulement quelques récepteurs à histamine ionotropiques sont caractérisés chez les invertébrés (Roeder, 2003). Afin d'évaluer l'existence de récepteurs à histamine métabotropiques chez les invertébrés, une étude a identifié tous les récepteurs aminergiques métabotropiques pour l'ensemble du génome chez la drosophile (*Drosophila melanogaster*) et chez le nématode (*C. elegans.*) (Roeder, 2003). Lors de cette analyse, aucun homologue véritable pour les récepteurs histaminergiques métabotropiques n'était présent chez les invertébrés suggérant que ces récepteurs soient apparus ultérieurement à la divergence entre les vertébrés et les invertébrés. (Roeder, 2003). Cet exemple met en évidence l'importance d'élucider les voies de signalisation des nouveaux récepteurs d'invertébrés qui ne possèdent pas toujours d'homologue véritable chez les vertébrés. Par conséquent, une classification future

plus approfondie des OAR sans homologie avec les récepteurs adrénergiques de vertébrés serait à envisager.

3.7 Le profil pharmacologique

À dire vrai, une grande variabilité existe entre les profils pharmacologiques des OAR caractérisés jusqu'à présent. En ce qui concerne les expériences pour la détermination du profil pharmacologique de Spi-OAR, aucun antagoniste n'a montré un quelconque effet (Fig. 8B, p.72). D'autre part, la forte concentration d'OA ($10\mu\text{M}$) utilisée lors de ces expériences pourrait expliquer l'inefficacité des antagonistes. De plus, l'ordre d'efficacité pour les agonistes diffère entre Spi-OAR et les récepteurs de drosophile (DmOct β 1, DmOct β 2 et DmOct β 3) appartenant au même sous-groupe, et ce, malgré le fait que ces récepteurs soient fortement similaires avec une voie de signalisation *in vitro* identique (Evans et Maqueira, 2005) (Fig. 8A, p.72). Pour ce qui est de l'efficacité des agonistes testés pour Spi-OAR, les expériences démontrent que l'agoniste clonidine est plus efficace que la naphazoline. Il est également intéressant de noter que les profils pharmacologiques des trois récepteurs à drosophile (DmOct β 1, DmOct β 2 et DmOct β 3) diffèrent entre eux ainsi qu'avec Spi-OAR et avec ceux résultant des expériences précédentes utilisant des préparations neuromusculaires de locuste (Evans et Robb, 1993). Cette variabilité démontre encore une fois la difficulté d'établir une classification des OAR sur la base du profil pharmacologique (Evans et Robb, 1993).

D'un autre côté, il est possible que notre protocole expérimental n'ait pas été optimal et assez sensible pour révéler le profil pharmacologique de Spi-OAR tel que vu précédemment. L'élaboration d'une analyse de radioliation à l'aide d'un ligand radioactif telle la rauwolscine serait une alternative intéressante pour la détermination de l'affinité relative de chaque agoniste et antagoniste pour Spi-OAR.

3.8 La localisation de l'ARNm de Spi-OAR

L'analyse de RT-PCR révèle une expression ubiquitaire de l'ARNm de Spi-OAR dans tous les tissus ainsi que dans tous les stades embryonnaires examinés (Fig. 9, p.74). Cela suggère que Spi-OAR est capable de jouer une variété de rôles potentiels qui restent à déterminer dans des études futures. En effet, l'OA possède une variété d'implications physiologiques modulatrices chez les invertébrés et par conséquent, il est difficile de spéculer sur la fonction biologique possible de Spi-OAR (Roeder et al., 2003).

D'ailleurs, Spi-OAR pourrait avoir un rôle chez les larves trocophores, par exemple au niveau de la formation du système nerveux ou au niveau de la motilité ciliaire, ces deux rôles biologiques possibles n'ayant jamais été examinés à notre connaissance et méritant des considérations futures. Il est à noter que l'implication fonctionnelle sur l'activité ciliaire des larves chez la moule (*Mytilus edulis*) a déjà été démontrée pour certaines amines telles la 5-HT, la dopamine et l'épinéphrine (Beiras et Widdows, 1995). Selon des courbes doses-réponses, l'implication de ces trois molécules neuroactives sur le contrôle neuronal de la motilité ciliaire lors de la nage ainsi que lors de la capture de nourriture a été observée chez les larves de moule (Beiras et Widdows, 1995). Dans cette étude, la dopamine ($>10^{-6}$ M) ainsi que l'épinéphrine ($>10^{-7}$ M) ont induit des effets inhibiteurs sur le taux d'ingestion et la clairance de la nourriture et ont inhibé la locomotion ciliaire des larves. En ce qui concerne la 5-HT (entre 10^{-8} et 3×10^{-7} M), elle a induit un effet excitateur en augmentant le taux d'ingestion de nourriture. De plus, la 5-HT (3×10^{-7} et 10^{-6} M) a engendré une activation de la nage des larves (Beiras et Widdows, 1995). Ces observations suggèrent que l'innervation des cellules ciliaires chez la larve trocophore de moule comprend des fibres sérotoninergiques excitatrices ainsi que des fibres dopaminergiques et adrénnergiques inhibitrices.

D'autre part, une expression ubiquitaire de l'ARNm est également observable chez d'autres OAR. Malgré cette expression ubiquitaire, le récepteur OAMB possède une fonction très bien établie en reproduction telle que décrite dans l'introduction (Lee et al., 2009) et ce récepteur est susceptible de jouer également un rôle au niveau du système nerveux. L'ARNm de Spi-OAR pourrait alors être exprimé dans divers tissus tout en ayant un rôle spécifique dans la reproduction de la palourde. En outre, Spi-OAR est susceptible d'avoir plusieurs fonctions selon sa localisation cellulaire et tissulaire.

3.9 La reproduction

En ce qui concerne la reproduction chez la palourde, la 5-HT est connue pour induire la réactivation méiotique des ovocytes (Krantic et al., 1991; Krantic et al., 1993b). Il était par conséquent possible que l'OA puisse influencer semblablement ce processus chez la palourde en engendrant la GVBD des ovocytes via Spi-OAR ou via un autre récepteur ovocytaire à OA. Lors d'une étude précédente, l'OA n'avait pas été testée à cet effet parmi une série d'amines incluant l'histamine, la dopamine, l'acétylcholine, le carbacole, l'épinéphrine, la norépinéphrine et la clonidine (Krantic et al., 1991). Au cours de nos expériences, aucun effet sur le processus de réactivation méiotique ovocytaire n'a été observé lors d'une application d'OA sur des ovocytes isolés. De même, l'OA ne s'oppose ni ne renforce aucunement l'induction de la GVBD lors d'une activation avec de la 5-HT ou du KCl, deux activateurs méiotiques connus (Fig. 10, p.76). Il est alors plausible que l'ARNm de Spi-OAR soit présent au niveau des ovocytes de la palourde sans toutefois avoir une expression protéique. Spi-OAR n'aurait alors aucun rôle fonctionnel dans les ovocytes, du moins dans le déclenchement de la méiose. Dans ce cas, il est intéressant d'envisager des expériences ultérieures de « Western blot » afin d'évaluer l'expression protéique de Spi-OAR, et ce, pour les différents tissus et stades embryonnaires examinés au cours

de ce projet. D'autre part, certaines études ont également démontré une augmentation du Ca^{2+} intracellulaire ainsi qu'une hausse de l'AMPc lors de la réactivation méiotique par la 5-HT des ovocytes de la palourde (Yi et al., 2002). Puisque Spi-OAR induit dans des systèmes hétérologues uniquement une hausse de l'AMPc (Fig. 5-6, p.66-68), il serait pertinent d'envisager des expériences pour la quantification de ce second messenger lors d'une stimulation *in situ* des ovocytes isolés avec de l'OA. En effet, Spi-OAR pourrait engendrer une hausse de l'AMPc sans fluctuation du Ca^{2+} intracellulaire dans les ovocytes, ce qui expliquerait l'absence de réactivation méiotique qui nécessite cette élévation du Ca^{2+} intracellulaire. En revanche, il est fortement possible que Spi-OAR ne possède tout simplement aucune influence sur le processus méiotique chez la palourde.

Dans un autre ordre d'idée, il est connu que la 5-HT déclenche le processus de ponte (Hirai et al., 1988) et qu'un réseau sérotoninergique soit présent dans les gonades de la palourde (Masseau et al., 2002). En effet, au cours du cycle gamétogénétique, la mise en évidence par immunohistochimie d'innervations sérotoninergiques couvrant l'épithélium germinatif des acini a été observée. La 5-HT relâchée par ces projections nerveuses pourrait possiblement jouer un rôle de neurohormone inductrice de ponte chez la palourde. Lors de cette étude, aucune détection d'immunoréactivité de la 5-HT n'a été observée à l'intérieur des acini où se localisent les ovocytes ou les spermatozoïdes (Masseau et al., 2002). Il est plausible que l'OA contrôle la ponte de concert avec la 5-HT. Par exemple chez la locuste (*Locusta migratoria*), l'OA et son précurseur la tyramine possèdent des fonctions complémentaires qui permettent la contraction musculaire de l'oviducte (Lange, 2004; Lange, 2009a). L'action de la tyramine sur les muscles viscéraux de l'oviducte varie selon la dose : à une faible concentration (10^{-10} - 10^{-8} M), cette amine induit une augmentation de l'amplitude des contractions musculaires et à de fortes doses ($>10^{-7}$ M), la tyramine diminue - tout comme l'OA - l'induction spontanée des contractions musculaires de l'oviducte (Lange et Nykamp, 1996; Orchard et Lange, 1985). La

tyramine et l'OA sont par conséquent capables d'induire une relaxation musculaire complémentaire de l'oviducte chez la locuste (Nykamp et Lange, 2000; Orchard et Lange, 1985) via une élévation de l'AMPc (Lange, 2004; Lange et Orchard, 1986) lors de la ponte des ovocytes matures. D'un autre côté, le contrôle des contractions de l'oviducte chez la drosophile est occasionné par le glutamate et l'OA qui possèdent des actions opposées. La ponte est induite lors de la synchronisation de la relaxation musculaire de l'oviducte par l'OA via OAMB (Lee et al., 2009) et de l'induction de la contraction musculaire de l'oviducte par le glutamate (Rodriguez-Valentin et al., 2006). Une co-expression du glutamate et de l'OA a été observée au niveau des innervations viscérales abdominales chez l'adulte (Rodriguez-Valentin et al., 2006). Il est alors possible que l'OA possède des fonctions opposées à la 5-HT lors de la ponte chez la palourde en inhibant plutôt la relâche des ovocytes matures. Une étude a d'ailleurs suggéré que la 5-HT ainsi que l'OA exogène induisent des réponses comportementales opposées agissant comme antagoniste notamment lors de la ponte des ovocytes matures chez le nématode (*C. elegans*) (Horvitz et al., 1982). En effet, la 5-HT est capable d'induire l'expulsion d'un plus grand nombre d'ovocytes matures et l'OA est capable d'altérer ce mécanisme (Horvitz et al., 1982). Au cours d'une autre étude portant sur l'induction de la ponte chez la palourde, l'OA n'a jamais été testée parmi une série de drogues incluant la 5-HT, la dopamine, l'acétylcholine et l'acide γ -aminobutyrique (Hirai et al., 1988). L'investigation potentielle de l'OA lors de la ponte des ovocytes matures serait à considérer dans une étude prochaine afin de déterminer si l'OA a un effet inducteur sur la ponte ou un effet inhibiteur capable d'altérer l'activation de la ponte par la 5-HT. D'autre part, il serait envisageable d'effectuer des études d'immunohistochimie à l'aide d'un anticorps spécifique à OA afin de permettre la localisation cellulaire de cette amine dans les tissus de la palourde notamment dans les gonades, et ce, au cours des différentes phases gamétogénétiques. Cette méthode expérimentale permettrait de vérifier l'existence d'une colocalisation entre la 5-HT et l'OA. Par conséquent, il est plausible qu'un réseau octopaminergique couvre également l'épithélium germinatif des acini

permettant la relâche de l'OA dans les gonades. Parallèlement, des analyses d'hybridation *in situ* à l'aide de sondes moléculaires spécifiques pour l'expression de l'ARNm de Spi-OAR pourraient dans ce cas confirmer si Spi-OAR se localise au niveau de l'épithélium germinatif des acini ou ailleurs dans les gonades de la palourde. De plus, une quantification de l'OA par chromatographie liquide à haute pression avec détection électrochimique (CLHP/DE) permettrait également d'obtenir des données additionnelles sur la quantification de l'OA au cours du cycle gamétogénétique. Des expériences supplémentaires sont vraisemblablement nécessaires afin de déterminer le rôle potentiel de l'OA dans la reproduction des bivalves ainsi que d'établir l'implication fonctionnelle de Spi-OAR chez la palourde.

En conclusion, ce projet avait pour but de compléter la caractérisation pharmacologique de base de Spi-OAR, le premier OAR caractérisé chez la palourde et un nouveau membre du sous-groupe « β -adrenergic-like ». La découverte de ce récepteur suggère que l'OA joue un rôle fonctionnel chez les mollusques et non seulement chez les insectes et les crustacés. Spi-OAR est un récepteur membranaire (RCPG) à octopamine couplé à une protéine Gs qui engendre une élévation du niveau d'AMPC intracellulaire. Ce récepteur est légèrement activé par la tyramine, le précurseur de l'OA, et il possède une faible activité constitutive dans les cellules hôtes. Une analyse RT-PCR a révélé la présence de l'ARNm de Spi-OAR non seulement dans les ovocytes, mais également dans les différents tissus et stades embryonnaires examinés. Finalement, l'ajout d'OA à des ovocytes isolés n'a provoqué aucun effet sur la reprise de la méiose. Le rôle fonctionnel de Spi-OAR chez la palourde reste à être déterminé dans des études futures. D'ailleurs, l'implication de l'OA chez la palourde, notamment lors de la ponte des ovocytes matures et lors du début du développement embryonnaire particulièrement au cours de la formation du système nerveux et de la motilité ciliaire des larves, peut désormais être analysée en profondeur. Une étude d'immunohistochimie serait à envisager afin de déterminer le début de la biosynthèse de l'OA dans les larves

trochophores ainsi que pour vérifier l'existence d'un réseau octopaminergique dans les gonades de la palourde. L'utilisation de ce mollusque bivalve dans la recherche des OAR permet, selon des perspectives évolutives, d'élaborer une analyse plus exhaustive de ces récepteurs dans le règne animal tout en fournissant des données supplémentaires sur les OAR des lophotrochozoaires, plus particulièrement en ce qui concerne l'embranchement des mollusques. Les découvertes issues de ce modèle animal plus simple aideront dans l'analyse des fonctions des récepteurs aminergiques apparentés dans le système des organismes supérieurs, notamment chez les mammifères, et permettront de mieux comprendre le processus d'émergence évolutive des OAR et de manière plus générale, des RCPG.

4. BIBLIOGRAPHIE

- Allen, R. D., 1953. Fertilization and artificial activation in the egg of the surf clam *Spisula solidissima*. Biol Bull. 105, 213-239.
- Allgeier, A., Laugwitz, K. L., Van Sande, J., Schultz, G., Dumont, J. E., 1997. Multiple G-protein coupling of the dog thyrotropin receptor. Mol Cell Endocrinol. 127, 81-90.
- Amireault, P., Dubé, F., 2005a. Intracellular cAMP and calcium signaling by serotonin in mouse cumulus-oocyte complexes. Mol Pharmacol. 68, 1678-1687.
- Amireault, P., Dubé, F., 2005b. Serotonin and its antidepressant-sensitive transport in mouse cumulus-oocyte complexes and early embryos. Biol Reprod. 73, 358-365.
- Anctil, M., Hayward, D. C., Miller, D. J., Ball, E. E., 2007. Sequence and expression of four coral G protein-coupled receptors distinct from all classifiable members of the rhodopsin family. Gene. 392, 14-21.
- Angers, A., Storozhuk, M. V., Duchaine, T., Castellucci, V. F., DesGroseillers, L., 1998. Cloning and functional expression of an *Aplysia* 5-HT receptor negatively coupled to adenylate cyclase. J Neurosci. 18, 5586-5593.
- Arora, K. K., Cheng, Z., Catt, K. J., 1997. Mutations of the conserved DRS motif in the second intracellular loop of the gonadotropin-releasing hormone receptor affect expression, activation, and internalization. Mol Endocrinol. 11, 1203-1212.

- Attwood, T. K., Findlay, J. B., 1994. Fingerprinting G-protein-coupled receptors. *Protein Eng.* 7, 195-203.
- Axelrod, J., Saavedra, J. M., 1977. Octopamine. *Nature.* 265, 501-504.
- Balfanz, S., Strunker, T., Frings, S., Baumann, A., 2005. A family of octopamine [corrected] receptors that specifically induce cyclic AMP production or Ca^{2+} release in *Drosophila melanogaster*. *J Neurochem.* 93, 440-451.
- Barbas, D., Campbell, A., Castellucci, V. F., DesGroseillers, L., 2005. Comparative localization of two serotonin receptors and sensorin in the central nervous system of *Aplysia californica*. *J Comp Neurol.* 490, 295-304.
- Barbas, D., Zappulla, J. P., Angers, S., Bouvier, M., Mohamed, H. A., Byrne, J. H., Castellucci, V. F., DesGroseillers, L., 2006. An aplysia dopamine1-like receptor: molecular and functional characterization. *J Neurochem.* 96, 414-427.
- Bargmann, C. I., 1998. Neurobiology of the *Caenorhabditis elegans* genome. *Science.* 282, 2028-2033.
- Beiras, R., Widdows, J., 1995. Effect of the neurotransmitters dopamine, serotonin and norepinephrine on the ciliary activity of mussel (*Mytilus edulis*) larvae. *Mar Biol.* 122, 597-603.
- Benovic, J. L., Kuhn, H., Weyand, I., Codina, J., Caron, M. G., Lefkowitz, R. J., 1987. Functional desensitization of the isolated beta-adrenergic receptor by the beta-adrenergic receptor kinase: potential role of an analog of the retinal protein arrestin (48-kDa protein). *Proc Natl Acad Sci U S A.* 84, 8879-8882.
- Bischof, L. J., Enan, E. E., 2004. Cloning, expression and functional analysis of an octopamine receptor from *Periplaneta americana*. *Insect Biochem Mol Biol.* 34, 511-521.

- Blenau, W., Balfanz, S., Baumann, A., 2000. Amtyr1: characterization of a gene from honeybee (*Apis mellifera*) brain encoding a functional tyramine receptor. *J Neurochem.* 74, 900-908.
- Blenau, W., Baumann, A., 2001. Molecular and pharmacological properties of insect biogenic amine receptors: lessons from *Drosophila melanogaster* and *Apis mellifera*. *Arch Insect Biochem Physiol.* 48, 13-38.
- Blumenthal, E. M., 2003. Regulation of chloride permeability by endogenously produced tyramine in the *Drosophila* Malpighian tubule. *Am J Physiol Cell Physiol.* 284, C718-728.
- Bockaert, J., Pin, J. P., 1999. Molecular tinkering of G protein-coupled receptors: an evolutionary success. *EMBO J.* 18, 1723-1729.
- Bohm, S. K., Grady, E. F., Bunnett, N. W., 1997. Regulatory mechanisms that modulate signalling by G-protein-coupled receptors. *Biochem J.* 322 (Pt 1), 1-18.
- Borowsky, B., Adham, N., Jones, K. A., Raddatz, R., Artymyshyn, R., Ogozalek, K. L., Durkin, M. M., Lakhani, P. P., Bonini, J. A., Pathirana, S., et al., 2001. Trace amines: identification of a family of mammalian G protein-coupled receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98, 8966-8971.
- Bouchard, C., Ribeiro, P., Dubé, F., Anctil, M., 2003. A new G protein-coupled receptor from a primitive metazoan shows homology with vertebrate aminergic receptors and displays constitutive activity in mammalian cells. *J Neurochem.* 86, 1149-1161.
- Bouchard, C., Ribeiro, P., Dubé, F., Demers, C., Anctil, M., 2004. Identification of a novel aminergic-like G protein-coupled receptor in the cnidarian *Renilla koellikeri*. *Gene.* 341, 67-75.

- Bouvier, M., Hausdorff, W. P., De Blasi, A., O'Dowd, B. F., Kobilka, B. K., Caron, M. G., Lefkowitz, R. J., 1988. Removal of phosphorylation sites from the beta 2-adrenergic receptor delays onset of agonist-promoted desensitization. *Nature*. 333, 370-373.
- Bridges, T. M., Lindsley, C. W., 2008. G-protein-coupled receptors: from classical modes of modulation to allosteric mechanisms. *ACS Chem Biol*. 3, 530-541.
- Brody, T., Cravchik, A., 2000. *Drosophila melanogaster* G protein-coupled receptors. *J Cell Biol*. 150, F83-88.
- Buznikov, G. A., Lambert, H. W., Lauder, J. M., 2001. Serotonin and serotonin-like substances as regulators of early embryogenesis and morphogenesis. *Cell Tissue Res*. 305, 177-186.
- Campbell, N. A., *Biologie*, Québec: Éditions de renouveau pédagogique Inc, 1995. 614p.
- Cazzamali, G., Klaerke, D. A., Grimmelikhuijzen, C. J., 2005. A new family of insect tyramine receptors. *Biochem Biophys Res Commun*. 338, 1189-1196.
- Chang, D. J., Li, X. C., Lee, Y. S., Kim, H. K., Kim, U. S., Cho, N. J., Lo, X., Weiss, K. R., Kandel, E. R., Kaang, B. K., 2000. Activation of a heterologously expressed octopamine receptor coupled only to adenylyl cyclase produces all the features of presynaptic facilitation in *Aplysia* sensory neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 97, 1829-1834.
- Cicirelli, M. F., Smith, L. D., 1985. Cyclic AMP levels during the maturation of *Xenopus* oocytes. *Dev Biol*. 108, 254-258.

- Claing, A., Laporte, S. A., Caron, M. G., Lefkowitz, R. J., 2002. Endocytosis of G protein-coupled receptors: roles of G protein-coupled receptor kinases and beta-arrestin proteins. *Prog Neurobiol.* 66, 61-79.
- Clark, J., Lange, A. B., 2003. Octopamine modulates spermathecal muscle contractions in *Locusta migratoria*. *J Comp Physiol A.* 189, 105-114.
- Coe, W. R., 1943. Sexual differentiation in mollusks.I.Pelecypods. *Quart Rev Biol.* 18, 154-164.
- Colas, P., Dubé, F., 1998. Meiotic maturation in mollusc oocytes. *Semin Cell Dev Biol.* 9, 539-548.
- Cole, S. H., Carney, G. E., McClung, C. A., Willard, S. S., Taylor, B. J., Hirsh, J., 2005. Two functional but noncomplementing *Drosophila* tyrosine decarboxylase genes: distinct roles for neural tyramine and octopamine in female fertility. *J Biol Chem.* 280, 14948-14955.
- Consortium, 2004. The state of GPCR research in 2004. *Nat Rev Drug Discov.* 3, 577-626.
- Costello, D. P., Davidson, M. E., Eggers, A., Fox, M. H., Henley, C., 1957. Methods for obtaining and handling marine eggs and embryos. *Marine Biological Laboratory, Woods Hole, Massachusetts.* 247 pp.
- Côté, F., Fligny, C., Bayard, E., Launay, J. M., Gershon, M. D., Mallet, J., Vojdani, G., 2007. Maternal serotonin is crucial for murine embryonic development. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 104, 329-334.
- Cotecchia, S., 2007. Constitutive activity and inverse agonism at the α_1 adrenoceptors. *Biochem Pharmacol.* 73, 1076-1083.

- Crocker, A., Sehgal, A., 2008. Octopamine regulates sleep in drosophila through protein kinase A-dependent mechanisms. *J Neurosci.* 28, 9377-9385.
- da Silva, R., Lange, A. B., 2008. Tyramine as a possible neurotransmitter/neuromodulator at the spermatheca of the African migratory locust, *Locusta migratoria*. *J Insect Physiol.* 54, 1306-1313.
- David, J. C., Coulon, J. F., 1985. Octopamine in invertebrates and vertebrates. A review. *Prog Neurobiol.* 24, 141-185.
- De Lean, A., Stadel, J. M., Lefkowitz, R. J., 1980. A ternary complex model explains the agonist-specific binding properties of the adenylate cyclase-coupled beta-adrenergic receptor. *J Biol Chem.* 255, 7108-7117.
- de Ligt, R. A., Kourounakis, A. P., AP, I. J., 2000. Inverse agonism at G protein-coupled receptors: (patho)physiological relevance and implications for drug discovery. *Br J Pharmacol.* 130, 1-12.
- Devreotes, P. N., 1994. G protein-linked signaling pathways control the developmental program of *Dictyostelium*. *Neuron.* 12, 235-241.
- Dohlman, H. G., Thorner, J., Caron, M. G., Lefkowitz, R. J., 1991. Model systems for the study of seven-transmembrane-segment receptors. *Annu Rev Biochem.* 60, 653-688.
- Donini, A., Lange, A. B., 2004. Evidence for a possible neurotransmitter/neuromodulator role of tyramine on the locust oviducts. *J Insect Physiol.* 50, 351-361.
- Dubé, F., Amireault, P., 2007. Local serotonergic signaling in mammalian follicles, oocytes and early embryos. *Life Sci.* 81, 1627-1637.

- Dubé, F., Eckberg, W. R., 1997. Intracellular pH increase driven by an Na^+/H^+ exchanger upon activation of surf clam oocytes. *Dev Biol.* 190, 41-54.
- Erspamer, V., Boretti, G., 1951. Identification and characterization, by paper chromatography, of enteramine, octopamine, tyramine, histamine and allied substances in extracts of posterior salivary glands of octopoda and in other tissue extracts of vertebrates and invertebrates. *Arch Int Pharmacodyn Ther.* 88, 296-332.
- Evans, P. D., 1981. Multiple receptor types for octopamine in the locust. *J Physiol.* 318, 99-122.
- Evans, P. D., Maqueira, B., 2005. Insect octopamine receptors: a new classification scheme based on studies of cloned *Drosophila* G-protein coupled receptors. *Invert Neurosci.* 5, 111-118.
- Evans, P. D., O'Shea, M., 1978. The identification of an octopaminergic neurone and the modulation of a myogenic rhythm in the locust. *J Exp Biol.* 73, 235-260.
- Evans, P. D., Robb, S., 1993. Octopamine receptor subtypes and their modes of action. *Neurochem Res.* 18, 869-874.
- Farooqui, T., Robinson, K., Vaessin, H., Smith, B. H., 2003. Modulation of early olfactory processing by an octopaminergic reinforcement pathway in the honeybee. *J Neurosci.* 23, 5370-5380.
- Feinmesser, R., Miyazaki, I., Cheung, R., Freeman, J. L., Noyek, A. M., Dosch, H. M., 1992. Diagnosis of nasopharyngeal carcinoma by DNA amplification of tissue obtained by fine-needle aspiration. *N Engl J Med.* 326, 17-21.
- Ferguson, S. S. G., 2001. Evolving concept in G protein-coupled receptor endocytosis : The role in receptor desensitization and signaling. *Pharm Rev.* 53, 1-24.

- Fraser, C. M., Chung, F. Z., Wang, C. D., Venter, J. C., 1988. Site-directed mutagenesis of human beta-adrenergic receptors: substitution of aspartic acid-130 by asparagine produces a receptor with high-affinity agonist binding that is uncoupled from adenylate cyclase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 85, 5478-5482.
- Fredriksson, R., Lagerstrom, M. C., Lundin, L. G., Schioth, H. B., 2003. The G-protein-coupled receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups, and fingerprints. *Mol Pharmacol.* 63, 1256-1272.
- Fryxell, K. J., 1995. The evolutionary divergence of neurotransmitter receptors and second-messenger pathways. *J Mol Evol.* 41, 85-97.
- Galtsoff, P. S., 1961. Physiology of reproduction in molluscs. *Amer Zool.* 1, 273-289.
- Gerhardt, C. C., Bakker, R. A., Piek, G. J., Planta, R. J., Vreugdenhil, E., Leysen, J. E., Van Heerikhuizen, H., 1997a. Molecular cloning and pharmacological characterization of a molluscan octopamine receptor. *Mol Pharmacol.* 51, 293-300.
- Gerhardt, C. C., Lodder, H. C., Vincent, M., Bakker, R. A., Planta, R. J., Vreugdenhil, E., Kits, K. S., van Heerikhuizen, H., 1997b. Cloning and expression of a complementary DNA encoding a molluscan octopamine receptor that couples to chloride channels in HEK293 cells. *J Biol Chem.* 272, 6201-6207.
- Gether, U., 2000. Uncovering molecular mechanisms involved in activation of G protein-coupled receptors. *Endocr Rev.* 21, 90-113.
- Gilman, A. G., 1987. G proteins: transducers of receptor-generated signals. *Annu Rev Biochem.* 56, 615-649.

- Grohmann, L., Blenau, W., Erber, J., Ebert, P. R., Strunker, T., Baumann, A., 2003. Molecular and functional characterization of an octopamine receptor from honeybee (*Apis mellifera*) brain. *J Neurochem.* 86, 725-735.
- Gudermann, T., Kalkbrenner, F., Schultz, G., 1996. Diversity and selectivity of receptor-G protein interaction. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 36, 429-459.
- Hall, R. A., Premont, R. T., Chow, C. W., Blitzer, J. T., Pitcher, J. A., Claing, A., Stoffel, R. H., Barak, L. S., Shenolikar, S., Weinman, E. J., et al., 1998. The beta2-adrenergic receptor interacts with the Na⁺/H⁺-exchanger regulatory factor to control Na⁺/H⁺ exchange. *Nature.* 392, 626-630.
- Hall, R. A., Premont, R. T., Lefkowitz, R. J., 1999. Heptahelical receptor signaling: beyond the G protein paradigm. *J Cell Biol.* 145, 927-932.
- Han, K. A., Millar, N. S., Davis, R. L., 1998. A novel octopamine receptor with preferential expression in *Drosophila* mushroom bodies. *J Neurosci.* 18, 3650-3658.
- Han, K. A., Millar, N. S., Grotewiel, M. S., Davis, R. L., 1996. DAMB, a novel dopamine receptor expressed specifically in *Drosophila* mushroom bodies. *Neuron.* 16, 1127-1135.
- Hirai, S., Kishimoto, T., Kadam, A. L., Kanatani, H., Koide, S. S., 1988. Induction of spawning and oocyte maturation by 5-hydroxytryptamine in the surf clam. *J Exp Zool.* 245, 318-321.
- Horvitz, H. R., Chalfie, M., Trent, C., Sulston, J. E., Evans, P. D., 1982. Serotonin and octopamine in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Science.* 216, 1012-1014.

- Hoyer, S. C., Eckart, A., Herrel, A., Zars, T., Fischer, S. A., Hardie, S. L., Heisenberg, M., 2008. Octopamine in male aggression of *Drosophila*. *Curr Biol*. 18, 159-167.
- Im, D. S., 2002. Orphan G protein-coupled receptors and beyond. *Jpn J Pharmacol*. 90, 101-106.
- Ji, T. H., Grossmann, M., Ji, I., 1998. G protein-coupled receptors. I. Diversity of receptor-ligand interactions. *J Biol Chem*. 273, 17299-17302.
- Juneja, R., Segal, S. J., Koide, S. S., 1993. Promotion of fertilizability of *Spisula* oocytes with 5-hydroxytryptamine. *Invertebr Reprod Dev*. 24, 103-106.
- Kamesh, N., Aradhyam, G. K., Manoj, N., 2008. The repertoire of G protein-coupled receptors in the sea squirt *Ciona intestinalis*. *BMC Evol Biol*. 8, 129.
- Kempf, J., Snook, L. A., Vonesch, J. L., Dahms, T. E., Pattus, F., Massotte, D., 2002. Expression of the human mu opioid receptor in a stable Sf9 cell line. *J Biotechnol*. 95, 181-187.
- Koenig, J. A., Edwardson, J. M., 1997. Endocytosis and recycling of G protein-coupled receptors. *Trends Pharmacol Sci*. 18, 276-287.
- Kolakowski, L. F., Jr., 1994. GCRDb: a G-protein-coupled receptor database. *Receptors Channels*. 2, 1-7.
- Krantic, S., Dube, F., Guerrier, P., 1993a. Evidence for a new subtype of serotonin receptor in oocytes of the surf clam *Spisula solidissima*. *Gen Comp Endocrinol*. 90, 125-131.
- Krantic, S., Dubé, F., Quirion, R., Guerrier, P., 1991. Pharmacology of the serotonin-induced meiosis reinitiation in *Spisula solidissima* oocytes. *Dev Biol*. 146, 491-498.

- Krantic, S., Guerrier, P., Dube, F., 1993b. Meiosis reinitiation in surf clam oocytes is mediated via a 5-hydroxytryptamine₅ serotonin membrane receptor and a vitelline envelope-associated high affinity binding site. *J Biol Chem.* 268, 7983-7989.
- Kreiling, J. A., Jessen-Eller, K., Miller, J., Seegal, R. F., Reinisch, C. L., 2001. Early development of the serotonergic and dopaminergic nervous system in *Spisula solidissima* (surf clam) larvae. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol.* 130, 341-351.
- Kunishima, N., Shimada, Y., Tsuji, Y., Sato, T., Yamamoto, M., Kumasaka, T., Nakanishi, S., Jingami, H., Morikawa, K., 2000. Structural basis of glutamate recognition by a dimeric metabotropic glutamate receptor. *Nature.* 407, 971-977.
- Kurten, R. C., 2003. Sorting motifs in receptor trafficking. *Adv Drug Deliv Rev.* 55, 1405-1419.
- Lambricht, D. G., Sondek, J., Bohm, A., Skiba, N. P., Hamm, H. E., Sigler, P. B., 1996. The 2.0 Å crystal structure of a heterotrimeric G protein. *Nature.* 379, 311-319.
- Lander, E. S., Linton, L. M., Birren, B., Nusbaum, C., Zody, M. C., Baldwin, J., Devon, K., Dewar, K., Doyle, M., FitzHugh, W., et al., 2001. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature.* 409, 860-921.
- Lange, A. B., 2004. A neurohormonal role for serotonin in the control of locust oviducts. *Arch Insect Biochem Physiol.* 56, 179-190.
- Lange, A. B., 2009a. Neural mechanisms coordinating the female reproductive system in the locust. *Front Biosci.* 14, 4401-4415.

- Lange, A. B., 2009b. Tyramine: from octopamine precursor to neuroactive chemical in insects. *Gen Comp Endocrinol.* 162, 18-26.
- Lange, A. B., da Silva, R., 2007. Neural and hormonal control of muscular activity of the spermatheca in the locust, *Locusta migratoria*. *Peptides.* 28, 174-184.
- Lange, A. B., Nykamp, D. A., 1996. Signal transduction pathways regulating the contraction of an insect visceral muscle. *Arch Insect Biochem Physiol.* 33, 183-196.
- Lange, A. B., Orchard, I., 1986. Identified octopaminergic neurons modulate contractions of locust visceral muscle via adenosine 3',5'-monophosphate (cyclic AMP). *Brain Res.* 363, 340-349.
- Lee, H. G., Rohila, S., Han, K. A., 2009. The octopamine receptor OAMB mediates ovulation via Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II in the *Drosophila* oviduct epithelium. *PLoS ONE.* 4, e4716.
- Lee, H. G., Seong, C. S., Kim, Y. C., Davis, R. L., Han, K. A., 2003. Octopamine receptor OAMB is required for ovulation in *Drosophila melanogaster*. *Dev Biol.* 264, 179-190.
- Lefkowitz, J. R., Shenoy, S. K., 2005. Transduction of receptor signal by β -arrestins. *Science.* 308, 512-517.
- Lefkowitz, R. J., 2000. The superfamily of heptahelical receptors. *Nat Cell Biol.* 2, E133-136.
- Lefkowitz, R. J., 2007. Seven transmembrane receptors: a brief personal retrospective. *Biochim Biophys Acta.* 1768, 748-755.

- Lefkowitz, R. J., Cotecchia, S., Samama, P., Costa, T., 1993. Constitutive activity of receptors coupled to guanine nucleotide regulatory proteins. Trends Pharmacol Sci. 14, 303-307.
- Li, X. C., Giot, J. F., Kuhl, D., Hen, R., Kandel, E. R., 1995. Cloning and characterization of two related serotonergic receptors from the brain and the reproductive system of *Aplysia* that activate phospholipase C. J Neurosci. 15, 7585-7591.
- Logothetis, D. E., Kurachi, Y., Galper, J., Neer, E. J., Clapham, D. E., 1987. The beta gamma subunits of GTP-binding proteins activate the muscarinic K⁺ channel in heart. Nature. 325, 321-326.
- Lu, Z. L., Saldanha, J. W., Hulme, E. C., 2002. Seven-transmembrane receptors: crystals clarify. Trends Pharmacol Sci. 23, 140-146.
- Malamud, J. G., Miszin, A. P., Josephson, R. K., 1988. The effects of octopamine on contraction kinetics and power output of the locust flight muscle. J Comp Physiol. 165, 827-835.
- Maller, J. L., 1985. Regulation of amphibian oocyte maturation. Cell Differ. 16, 211-221.
- Maqueira, B., Chatwin, H., Evans, P. D., 2005. Identification and characterization of a novel family of *Drosophila* beta-adrenergic-like octopamine G-protein coupled receptors. J Neurochem. 94, 547-560.
- Marinissen, M. J., Gutkind, J. S., 2001. G-protein-coupled receptors and signaling networks: emerging paradigms. Trends Pharmacol Sci. 22, 368-376.

- Masseau, I., Bannon, P., Anctil, M., Dubé, F., 2002. Localization and quantification of gonad serotonin during gametogenesis of the surf clam, *Spisula solidissima*. Biol Bull. 202, 23-33.
- Meijer, L., Dostmann, W., Genieser, H. G., Butt, E., Jastorff, B., 1989. Starfish oocyte maturation: evidence for a cyclic AMP-dependent inhibitory pathway. Dev Biol. 133, 58-66.
- Meijer, L., Zarutskie, P., 1987. Starfish oocyte maturation: 1-methyladenine triggers a drop of cAMP concentration related to the hormone-dependent period. Dev Biol. 121, 306-315.
- Merrill, A. S., Ropes, J. W., 1969. The general distribution of the surf clam and ocean quahog. Proc Nat Shellfish Assoc. 59, 40-45.
- Middleton, C. A., Nongthomba, U., Parry, K., Sweeney, S. T., Sparrow, J. C., Elliott, C. J., 2006. Neuromuscular organization and aminergic modulation of contractions in the Drosophila ovary. BMC Biol. 4, 17.
- Milligan, G., 2003. Constitutive activity and inverse agonists of G protein-coupled receptors: a current perspective. Mol Pharmacol. 64, 1271-1276.
- Molaei, G., Paluzzi, J. P., Bendena, W. G., Lange, A. B., 2005. Isolation, cloning, and tissue expression of a putative octopamine/tyramine receptor from locust visceral muscle tissues. Arch Insect Biochem Physiol. 59, 132-149.
- Monastirioti, M., 2003. Distinct octopamine cell population residing in the CNS abdominal ganglion controls ovulation in Drosophila melanogaster. Dev Biol. 264, 38-49.

- Monastirioti, M., Linn, C. E., Jr., White, K., 1996. Characterization of *Drosophila* tyramine beta-hydroxylase gene and isolation of mutant flies lacking octopamine. *J Neurosci.* 16, 3900-3911.
- Morisset, S., Rouleau, A., Ligneau, X., Gbahou, F., Tardivel-Lacombe, J., Stark, H., Schunack, W., Ganellin, C. R., Schwartz, J. C., Arrang, J. M., 2000. High constitutive activity of native H3 receptors regulates histamine neurons in brain. *Nature.* 408, 860-864.
- Nagaya, Y., Kutsukake, M., Chigusa, S. I., Komatsu, A., 2002. A trace amine, tyramine, functions as a neuromodulator in *Drosophila melanogaster*. *Neurosci Lett.* 329, 324-328.
- Nathanson, J. A., Greengard, P., 1973. Octopamine-sensitive adenylate cyclase: evidence for a biological role of octopamine in nervous tissue. *Science.* 180, 308-310.
- Neer, E. J., 1995. Heterotrimeric G proteins: organizers of transmembrane signals. *Cell.* 80, 249-257.
- Neves, S. R., Ram, P. T., Iyengar, R., 2002. G protein pathways. *Science.* 296, 1636-1639.
- New, D. C., Wong, J. T., 1998. The evidence for G-protein-coupled receptors and heterotrimeric G proteins in protozoa and ancestral metazoa. *Biol Signals Recept.* 7, 98-108.
- Nykamp, D. A., Lange, A. B., 2000. Interaction between octopamine and proctolin on the oviducts of *Locusta migratoria*. *J Insect Physiol.* 46, 809-816.

- Okamoto, T., Murayama, Y., Hayashi, Y., Inagaki, M., Ogata, E., Nishimoto, I., 1991. Identification of a Gs activator region of the beta 2-adrenergic receptor that is autoregulated via protein kinase A-dependent phosphorylation. *Cell*. 67, 723-730.
- Oliveira, L., Paiva, A. C., Vriend, G., 1999. A low resolution model for the interaction of G proteins with G protein-coupled receptors. *Protein Eng.* 12, 1087-1095.
- Orchard, I., Lange, A. B., 1985. Evidence for octopaminergic modulation of an insect visceral muscle. *J Neurobiol.* 16, 171-181.
- Orchard, I., Lange, A. B., 1986. Pharmacological profile of octopamine receptors on the lateral oviducts of the locust, *Locusta-migratoria*. *J Insect Physiol.* 32, 741-745.
- Ormslaw, J. C., Elliott, C. J., 2006. Octopamine boosts snail locomotion: behavioural and cellular analysis. *Invert Neurosci.* 6, 215-220.
- Orr, N., Orr, G. L., Hollingworth, R. M., 1992. The Sf9 cell line as a model for studying insect octopamine-receptors. *Insect Biochem Mol Biol.* 22, 591-597.
- Ovchinnikov Yu, A., 1982. Rhodopsin and bacteriorhodopsin: structure-function relationships. *FEBS Lett.* 148, 179-191.
- Pannabecker, T., Orchard, I., 1986. Pharmacological properties of octopamine-2 receptors in locust neuroendocrine tissue. *J Insect Physiol.* 32, 909-915.

- Pantaloni, C., Brabet, P., Bilanges, B., Dumuis, A., Houssami, S., Spengler, D., Bockaert, J., Journot, L., 1996. Alternative splicing in the N-terminal extracellular domain of the pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) receptor modulates receptor selectivity and relative potencies of PACAP-27 and PACAP-38 in phospholipase C activation. *J Biol Chem.* 271, 22146-22151.
- Pauwels, P. J., Wurch, T., 1998. Review: amino acid domains involved in constitutive activation of G-protein-coupled receptors. *Mol Neurobiol.* 17, 109-135.
- Perez, D. M., DeYoung, M. B., Graham, R. M., 1993. Coupling of expressed alpha 1B- and alpha 1D-adrenergic receptor to multiple signaling pathways is both G protein and cell type specific. *Mol Pharmacol.* 44, 784-795.
- Pflugger, H. J., Stevenson, P. A., 2005. Evolutionary aspects of octopaminergic systems with emphasis on arthropods. *Arthropod Struct Dev.* 34, 379-396.
- Pierce, K. L., Lefkowitz, R. J., 2001. Classical and new roles of beta-arrestins in the regulation of G-protein-coupled receptors. *Nat Rev Neurosci.* 2, 727-733.
- Pierce, K. L., Premont, R. T., Lefkowitz, R. J., 2002. Seven-transmembrane receptors. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 3, 639-650.
- Plakidou-Dymock, S., Dymock, D., Hooley, R., 1998. A higher plant seven-transmembrane receptor that influences sensitivity to cytokinins. *Curr Biol.* 8, 315-324.
- Rajagopal, K., Lefkowitz, R. J., Rockman, H. A., 2005. When 7 transmembrane receptors are not G protein-coupled receptors. *J Clin Invest.* 115, 2971-2974.

- Rex, E., Hapiak, V., Hobson, R., Smith, K., Xiao, H., Komuniecki, R., 2005. TYRA-2 (F01E11.5): a *Caenorhabditis elegans* tyramine receptor expressed in the MC and NSM pharyngeal neurons. *J Neurochem.* 94, 181-191.
- Robb, S., Cheek, T. R., Hannan, F. L., Hall, L. M., Midgley, J. M., Evans, P. D., 1994. Agonist-specific coupling of a cloned *Drosophila* octopamine/tyramine receptor to multiple second messenger systems. *Embo J.* 13, 1325-1330.
- Rodriguez-Valentin, R., Lopez-Gonzalez, I., Jorquera, R., Labarca, P., Zurita, M., Reynaud, E., 2006. Oviduct contraction in *Drosophila* is modulated by a neural network that is both, octopaminergic and glutamatergic. *J Cell Physiol.* 209, 183-198.
- Roeder, T., 1999. Octopamine in invertebrates. *Prog Neurobiol.* 59, 533-561.
- Roeder, T., 2003. Metabotropic histamine receptors--nothing for invertebrates? *Eur J Pharmacol.* 466, 85-90.
- Roeder, T., 2005. Tyramine and octopamine: ruling behavior and metabolism. *Annu Rev Entomol.* 50, 447-477.
- Roeder, T., Seifert, M., Kahler, C., Gewecke, M., 2003. Tyramine and octopamine: antagonistic modulators of behavior and metabolism. *Arch Insect Biochem Physiol.* 54, 1-13.
- Ropes, J. W., 1968. Reproductive cycle of the surf clam, *Spisula solidissima*, in offshore New Jersey. *Biol Bull.* 135, 349-365.
- Rosenthal, E. T., Hunt, T., Ruderman, J. V., 1980. Selective translation of mRNA controls the pattern of protein synthesis during early development of the surf clam, *Spisula solidissima*. *Cell.* 20, 487-494.

- Rosenthal, E. T., Ruderman, J. V., 1987. Widespread changes in the translation and adenylation of maternal messenger RNAs following fertilization of *Spisula* oocytes. *Dev Biol.* 121, 237-246.
- Rotte, C., Krach, C., Balfanz, S., Baumann, A., Walz, B., Blenau, W., 2009. Molecular characterization and localization of the first tyramine receptor of the American cockroach (*Periplaneta americana*). *Neuroscience.* 162, 1120-1133.
- Samama, P., Cotecchia, S., Costa, T., Lefkowitz, R. J., 1993. A mutation-induced activated state of the beta 2-adrenergic receptor. Extending the ternary complex model. *J Biol Chem.* 268, 4625-4636.
- Saudou, F., Amlaiky, N., Plassat, J. L., Borrelli, E., Hen, R., 1990. Cloning and characterization of a *Drosophila* tyramine receptor. *EMBO J.* 9, 3611-3617.
- Schultz, R. M., Montgomery, R. R., Belanoff, J. R., 1983. Regulation of mouse oocyte meiotic maturation: implication of a decrease in oocyte cAMP and protein dephosphorylation in commitment to resume meiosis. *Dev Biol.* 97, 264-273.
- Scott, M. G. H., Benmerah, A., Marullo, S., 2004. Endocytose des récepteurs couplés aux protéines G. *Med Sci.* 20, 78-83.
- Sibley, D. R., Strasser, R. H., Caron, M. G., Lefkowitz, R. J., 1985. Homologous desensitization of adenylate cyclase is associated with phosphorylation of the beta-adrenergic receptor. *J Biol Chem.* 260, 3883-3886.
- Sidhu, A., Niznik, H. B., 2000. Coupling of dopamine receptor subtypes to multiple and diverse G proteins. *Int J Dev Neurosci.* 18, 669-677.

- Sodergren, E., Weinstock, G. M., Davidson, E. H., Cameron, R. A., Gibbs, R. A., Angerer, R. C., Angerer, L. M., Arnone, M. I., Burgess, D. R., Burke, R. D., et al., 2006. The genome of the sea urchin *Strongylocentrotus purpuratus*. *Science*. 314, 941-952.
- Spence, P., Bard, J., Jones, P. G., Betty, M., 1998. The identification of G-protein coupled receptors in sequence databases. *Exp Opin Ther Pat*. 8, 235-247.
- Stanislaus, D., Ponder, S., Ji, T. H., Conn, P. M., 1998. Gonadotropin-releasing hormone receptor couples to multiple G proteins in rat gonadotrophs and in GGH3 cells: evidence from palmitoylation and overexpression of G proteins. *Biol Reprod*. 59, 579-586.
- Stickney, A. P., 1963. Histology of the reproductive system of the soft-shell clam (*Mya arenaria*). *Biol Bull*. 125, 344-351.
- Stricker, S. A., Smythe, T. L., 2001. 5-HT causes an increase in cAMP that stimulates, rather than inhibits, oocyte maturation in marine nemertean worms. *Development*. 128, 1415-1427.
- Tierney, A. J., 2001. Structure and function of invertebrate 5-HT receptors: a review. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*. 128, 791-804.
- Tu, J. C., Xiao, B., Yuan, J. P., Lanahan, A. A., Leoffert, K., Li, M., Linden, D. J., Worley, P. F., 1998. Homer binds a novel proline-rich motif and links group 1 metabotropic glutamate receptors with IP3 receptors. *Neuron*. 21, 717-726.
- Tusnady, G. E., Simon, I., 2001. The HMMTOP transmembrane topology prediction server. *Bioinformatics*. 17, 849-850.

- Vanden Broeck, J., Vulsteke, V., Huybrechts, R., De Loof, A., 1995. Characterization of a cloned locust tyramine receptor cDNA by functional expression in permanently transformed *Drosophila* S2 cells. *J Neurochem.* 64, 2387-2395.
- Vehovszky, A., Elliott, C. J. H., Voronezhskaya, E. E., Hiripi, L., Elekes, K., 1998. Octopamine : a new feeding modulator in *Lymnaea*. *Philos Trans R Soc Lond B.* 353, 1631-1643.
- Vivarelli, E., Conti, M., De Felici, M., Siracusa, G., 1983. Meiotic resumption and intracellular cAMP levels in mouse oocytes treated with compounds which act on cAMP metabolism. *Cell Differ.* 12, 271-276.
- von Nickisch-Roseneck, E., Krieger, J., Kubick, S., Laage, R., Strobel, J., Strotmann, J., Breer, H., 1996. Cloning of biogenic amine receptors from moths (*Bombyx mori* and *Heliothis virescens*). *Insect Biochem Mol Biol.* 26, 817-827.
- Voronezhskaya, E. E., Nezlin, L. P., Odintsova, N. A., Plummer, J. T., Croll, R. P., 2008. Neuronal development in larval mussel *Mytilus trossulus* (Mollusca : Bivalvia). *Zoomorphology.* 127, 97-110.
- Wall, M. A., Coleman, D. E., Lee, E., Iniguez-Lluhi, J. A., Posner, B. A., Gilman, A. G., Sprang, S. R., 1995. The structure of the G protein heterotrimer Gi alpha 1 beta 1 gamma 2. *Cell.* 83, 1047-1058.
- Weiss, J. M., Morgan, P. H., Lutz, M. W., Kenakin, T. P., 1996. The cubic ternary complex receptor-occupancy model. III. resurrecting efficacy. *J Theor Biol.* 181, 381-397.

- Xiao, B., Tu, J. C., Petralia, R. S., Yuan, J. P., Doan, A., Breder, C. D., Ruggiero, A., Lanahan, A. A., Wenthold, R. J., Worley, P. F., 1998. Homer regulates the association of group 1 metabotropic glutamate receptors with multivalent complexes of homer-related, synaptic proteins. *Neuron*. 21, 707-716.
- Yi, J. H., Lefievre, L., Gagnon, C., Anctil, M., Dubé, F., 2002. Increase of cAMP upon release from prophase arrest in surf clam oocytes. *J Cell Sci*. 115, 311-320.
- Zhou, C., Rao, Y., Rao, Y., 2008. A subset of octopaminergic neurons are important for *Drosophila* aggression. *Nat Neurosci*. 11, 1059-1067.